



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

JUHANA SORVARI

Kahteen gradienttipariin perustuvan diffuusiopainotetun magneettikuvaussekvenssin in vivo -implementointi ja testaus

Diplomityö

Tarkastaja: professori Ilpo Vattulainen
Tarkastaja ja aihe hyväksytty Luonnon-
tieteiden ja ympäristötekniikan tiede-
kuntaneuvoston kokouksessa 9.5.2012

TIIVISTELMÄ

TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

Teknis-luonnontieteellinen koulutusohjelma

JUHANA SORVARI: Kahteen gradienttipariin perustuvan diffuusiopainotetun magneettikuvaussekvenssin *in vivo* -implementointi ja testaus

Diplomityö, 77 sivua, 8 liitesivua

Huhtikuu 2013

Pääaine: Teknillinen fysiikka

Tarkastaja: professori Ilpo Vattulainen

Avainsanat: magneettikuvaus, diffuusio, DTI, d-PFG, *in vivo*, *ex vivo*

Uusien magneettikuvausmenetelmien, kuten diffuusiopainotetun magneettikuvauksen kehittyminen, on mahdollistanut uudenlaisen informaation saamisen aivokudoksen mikrorakenteiden muodosta ja orientaatiosta sekä niiden muutoksista erilaisten aivosairauksien, kuten esimerkiksi epilepsian aikana. Tähän tarkoitukseen yleisesti käytetty menetelmä, diffuusiotensorikuvaus (DTI), luo vahvan kontrastin aivojen valkean ja harmaan aineen välille. Menetelmän heikkous on kuitenkin se, että harmaan aineen alueilla kontrasti keskiarvottuu rakenteiden satunnaisuuden takia, eikä sillä siten saada luotua kontrastia esimerkiksi eri harmaan aineen alueiden välille. Viimeisen vuosikymmenen aikana nopeasti kehittyneen kahteen diffuusiogradienttipariin perustuvan kulmariippuvan d-PFG-menetelmän on havaittu toimivan paremmin myös harmaan aineen alueilla. Menetelmä on kuitenkin vielä vahvasti kehitysvaiheessa ja sitä ei ole juurikaan käytetty *in vivo* -olosuhteissa.

Diplomityön tavoitteena oli implementoida kulmariippuva d-PFG-sekvenssi Itä-Suomen yliopiston biolääketieteellinen NMR -tutkimusryhmän *in vivo* -käytössä olevalle magneettikuvauslaitteelle ja testata sen toimivuutta. Työ koostui aluksi pulssisekvenssin ohjelmoinnista sekä *ex vivo*- ja *in vivo* -optimoinnista. Tämän jälkeen sekvenssillä suoritettiin *in vivo* -mittauksia Wistar-urosrotilla ja tuloksia verrattiin samoilla eläimillä tehtyihin DTI-mittauksiin. Lisäksi *in vivo* d-PFG -tuloksia verrattiin *ex vivo* -olosuhteissa tehtyyn d-PFG-mittaukseen sekä mikroskooppisuurenoksiin histologialeikkeistä.

Vaikka erilaiset mittaussparametrit ja -olosuhteet eivät sallineet saatujen tulosten tarkkaa kvantitatiivista vertailua *in vivo* DTI- tai *ex vivo* d-PFG -menetelmiin, tuloksista voidaan silti päätellä, että implementoitu d-PFG-sekvenssi toimii ja tuottaa odotettuja tuloksia. Sen todettiin tuottavan erilaista kontrastia kuin DTI, ja jossain määrin kontrastia saatiin myös harmaan aineen alueille. Menetelmä on lupaava, mutta sen tuottamien parametrien tarkoitus ei kuitenkaan ole vielä täysin tunnettu. Lisäksi sen antamat tulokset riippuvat gradienttien rotaatiotasosta, minä takia kulmariippuva d-PFG vaatii sekä teoreettista että kokeellista kehitystyötä kehittyäkseen varteenotettavaksi työkaluksi aivokudoksen karakterisoinnissa.

ABSTRACT

TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Master's Degree Programme in Science and Engineering

JUHANA SORVARI: In vivo implementation and testing of a double-pulsed-field-gradient diffusion weighted MRI sequence

Master of Science Thesis, 77 pages, 8 Appendix pages

April 2013

Major: Advanced Engineering Physics

Examiner: Professor Ilpo Vattulainen

Keywords: magnetic resonance imaging, diffusion, DTI, d-PFG, *in vivo*, *ex vivo*

The development of novel magnetic resonance imaging (MRI) methods, such as diffusion weighted MRI, has allowed to discover new kind of information of the shapes and orientations found in the brain tissue microstructures and of their alterations during different brain diseases, such as epilepsy. Diffusion tensor imaging (DTI), which is the method commonly used for this purpose, creates a strong contrast between the white and the gray matter tissues of the brain. However, the weakness of the method is that within gray matter areas the contrast is averaged due to the randomness of the structures and thus the method cannot create contrast for example between different gray matter areas. Based on two diffusion gradient pairs, the angular double-pulsed-field-gradient (d-PFG) method has been reported to function better also within gray matter areas. However, the method is still very new and developing and it has not been used in *in vivo* almost at all yet.

The objective of this thesis was to implement the angular d-PFG sequence to the *in vivo* MRI device of the biomedical NMR research group of the University of Eastern Finland and to test its functionality. The research consisted of programming the pulse sequence and its *ex vivo* and *in vivo* optimization. After this, *in vivo* measurements were performed with the sequence using male Wistar rats and the results were compared to *in vivo* DTI measurements performed with the same animals. In addition, the *in vivo* d-PFG results were compared to *ex vivo* d-PFG measurements and photomicrographs of histology sections.

Although the different measurement parameters and conditions did not allow accurate quantitative comparison of the results to *in vivo* DTI or *ex vivo* d-PFG methods, it can be still concluded from the results that the implemented d-PFG sequence works correctly and produces expected data. It was observed to produce a different kind of contrast than DTI, also to gray matter areas. Although the method is promising, the meaning of the parameters produced by it is not yet well known and in addition the results depend on the rotation plane of the gradients, so both theoretical and experimental research is needed in order for angular d-PFG to develop into a considerable tool for characterizing brain tissue.

ALKUSANAT

Tämä diplomityö on tehty Itä-Suomen yliopiston A.I. Virtanen -instituutissa biolääketieteellisen NMR:n tutkimusryhmässä Itä-Suomen yliopiston myöntämän apurahan turvin. Haluan kiittää professori Olli Gröhnää tämän mielenkiintoisen ja opettavaisen mahdollisuuden tarjoamisesta sekä työni ohjaajana ja neuvonantajana toimimisesta. Työn aikana olen oppinut valtavasti magneettikuvauksesta ja siihen liittyvästä mielenkiintoisesta tutkimuksesta. Haluan kiittää myös työni tarkastajaa, TTY:n fysiikan laitoksen professori Ilpo Vattulaista, hyvistä neuvoista ja näkemyksistä työn kokonaisuuteen liittyen.

Lisäksi haluan kiittää koko biolääketieteellisen NMR:n tutkimusryhmää mukavasta työilmapiiristä ja avusta kun sitä tarvitsin. Erityisesti haluan kiittää FM Tuukka Miettistä perehdyttämisestä DTI:n ja d-PFG:n pariin ja suuresta avusta mittausten käytännön toteuttamisessa ja datankäsittelyssä sekä PhD Alejandra Sierra Lopezia fyysikon totuttamisesta aivojen ihmeelliseen maailmaan, avusta koe-eläinten kanssa, histologiakuvista sekä kommenteista työn tuloksiin liittyen. Erityiskiitokset kuuluvat myös FM Teemu Laitiselle opastuksesta oikeaan suuntaan ohjelmoinnin kanssa sekä laboratoriomestari Maarit Pulkkiselle perfusointien tekemisestä sekä käytännön avusta laboratoriossa.

Viimeisenä haluan kiittää vanhempiani, siskoani sekä hyvää ystävääni Antti Ylistä, jotka jaksoivat kannustaa ja valaa uskoa työn valmistumiseen. Ilman teidän kannustustanne työn valmistuminen olisi venynyt kohtuuttoman pitkäksi.

Espoossa 11.3.2013

Juhana Sorvari

050 517 8278

juhana.sorvari@aalto.fi

SISÄLLYS

1. Johdanto	1
2. Magneettikuvauksen perusteet	3
2.1 Ydinmagneettinen resonanssi	3
2.1.1 Ilmiön fysikaalinen tausta	3
2.1.2 Relaksaatioajat ja signaalin syntyminen	5
2.2 Kuvanmuodostus	7
2.2.1 Aikaparametrit ja kontrastin luominen	7
2.2.2 Gradientit ja paikanmäärittäminen	10
2.2.3 k-avaruudesta lopulliseen kuvaan	11
2.2.4 Kuvanlaatu	12
2.3 Yleisimmät pulssisekvenssit	13
2.3.1 Spin-kaikuun pohjautuvat sekvenssit	14
2.3.2 Kenttäkaikuun pohjautuvat sekvenssit	15
2.3.3 EPI-kuvantaminen	17
2.4 Magneettikuvauslaitteistot	17
3. Diffuusio ja magneettikuvaus	21
3.1 Yleistä diffuusiosta	21
3.1.1 Satunnaiskävelymalli	21
3.1.2 Fickin lait ja todennäköisyystarkastelu	23
3.2 Diffuusio aivojen rakenteissa	24
3.2.1 Näennäinen diffuusiovakio	24
3.2.2 Diffuusiotensori	25
3.3 Diffuusiopainotettu magneettikuvaus	25
3.3.1 Diffuusio kontrastin lähteenä	25
3.3.2 Erilaiset diffuusiopainotukset ja b-arvo	27
3.4 Diffuusiotensorikuvaus	28
3.4.1 Kontrastia anisotrooppisesta diffuusiosta	28
3.4.2 DTI:n sovelluskohteet	31
3.4.3 DTI:n puutteet	32
3.5 Diffuusiokuvaus kahdella gradienttiparilla	32
3.5.1 Pulssisekvenssin rakenne	32
3.5.2 Kulmariippuva d-PFG-signaali	35
3.5.3 Aikaisempia d-PFG-kokeita	36
4. Pulssisekvenssin implementointi	39
4.1 ParaVision -ohjelmisto ja tiedostorakenne	39
4.2 Pulssisekvenssin ohjelmointi	40
4.2.1 Uusien parametrien määrittäminen	41

4.2.2	Pulssiohjelmätiedosto ja diffuusiomoduuli	41
4.2.3	Pulssiohjelmätiedoston muokkaus	44
4.2.4	Pulssisekvenssin ajoituksen ohjelmointi	45
4.3	Metodin kääntäminen ja testaus	47
5.	Materiaalit ja menetelmät	50
5.1	Magneettikuvauslaitteistot	50
5.2	Kuvantamiskohteet	51
5.3	Mittausten toteutus	52
5.3.1	Optimointimittaukset	52
5.3.2	Lopulliset <i>in vivo</i> -mittaukset	54
5.3.3	<i>Ex vivo</i> -vertailumittaus	54
5.4	Mittautulosten käsittely	56
5.4.1	Värikarttojen laskeminen	56
5.4.2	Signaali-kohinasuhteen määrittäminen	56
5.4.3	ROI-analyysit	57
5.4.4	Vertailu histologiakuviin	57
6.	Tulokset ja niiden tarkastelu	60
6.1	<i>Ex vivo</i> -vertailumittaus	60
6.2	Optimointimittaukset	61
6.2.1	<i>Ex vivo</i>	61
6.2.2	<i>In vivo</i>	62
6.3	Lopullisten <i>in vivo</i> -mittausten värikartat	64
6.4	ROI-analyysit	66
6.4.1	<i>In vivo</i> DTI ja d-PFG	66
6.4.2	<i>In vivo</i> ja <i>ex vivo</i> d-PFG	68
6.5	Virhelähteet ja luotettavuus	71
7.	Johtopäätökset ja suositukset	73
	Lähteet	74
	Liite A: Kaaviokuva implementoidusta sekvenssistä	78
	Liite B: DpfgEpi.ppg-tiedosto	79
	Liite C: Rotan aivokartta koronaalisesta leikkeestä	82
	Liite D: d-PFG-värikartat yhden eläimen kaikista leikkeistä	83
	Liite E: Kaikkien eläinten ROI-arvot	84

KUVAT

2.1	Nettomagnetisaation syntyminen	4
2.2	Poikkeutuskulma	6
2.3	T_1 -relaksaatio ja T_2 -vaimeneminen	7
2.4	Pulssisekvenssin aikaparametrit	8
2.5	Eri tavoin painotettuja magneettikuvia	9
2.6	Kaaviokuva k-avaruudesta	12
2.7	Kaaviokuva spin-kaikusekvenssistä	15
2.8	Kaaviokuva kenttäkaikusekvenssistä	16
2.9	Kaaviokuva EPI-sekvenssistä	18
2.10	Magneetikuvauslaitteiston rakenne	19
3.1	Satunnaiskävelymalli	22
3.2	Vapaa ja rajoitettu diffuusio	24
3.3	Kaaviokuva PFG-sekvenssistä	26
3.4	DW- ja ADC-kuvat	28
3.5	Isotrooppinen ja anisotrooppinen diffuusio	29
3.6	Kaaviokuva DTI-sekvenssistä	30
3.7	Diffusioellipsoidi	30
3.8	Biologisen kudoksen anisotropiat	33
3.9	Harmaan ja valkean aineen erot	33
3.10	Kaaviokuva d-PFG-sekvenssistä	34
3.11	Esimerkki d-PFG:n normalisoiduista intensiteettikuvaajista kulman funktiona	37
3.12	Esimerkki d-PFG-värikartoista rotan aivojen koronaalisesta leikkeestä	38
3.13	<i>Ex vivo</i> -vertailu d-PFG:n ja DTI:n välillä	38
4.1	Diffusiosekvenssityypin valintaan käytettävä aliohjelma	42
4.2	Spin-kaikutyyppisen diffusiosekvenssin toteuttava aliohjelma	43
4.3	Kaikuajan neljäosien laskeminen ennen tasausta	48
4.4	Kaikuajan taseaus	48
5.1	Mittauksissa käytetyt magneetikuvauslaitteet	51
5.2	<i>Ex vivo</i> -optimointimittauksissa käytetty fantomi	52
5.3	Esimerkki aE -kartasta rajatuista viidestä eri ROI-alueesta	59
5.4	Myeliinivärjätystä histologialeikkeestä otettujen kuvien sijainnit	59
6.1	Yhden leikkeen aE -, $ aE $ - ja φ -kartat <i>ex vivo</i> -vertailumittauksesta .	60
6.2	Värikartat jokaisesta <i>ex vivo</i> -optimointimittauksesta	62

6.3	Värikartat jokaisesta <i>in vivo</i> -optimointimittauksesta	63
6.4	Esimerkki eläimen TM60 yhden leikkeen <i>in vivo</i> d-PFG-värikartoista	64
6.5	Esimerkki eläimen TM60 yhden leikkeen DTI-värikartoista	64
6.6	Pylväsdiagrammit jokaisesta <i>in vivo</i> -mittausten ROI-alueesta	66
6.7	Mikroskooppisuurennot histologialeikkeestä	67
6.8	Vertailu jokaisesta ROI-alueesta <i>in vivo</i> - ja <i>ex vivo</i> -mittausten välillä	69
6.9	<i>In vivo</i> -mittausten suhteelliset intensiteettikuvaajat valkoisen aineen ROI-alueilta	70
6.10	<i>In vivo</i> -mittausten suhteelliset intensiteettikuvaajat harmaan aineen ROI-alueilta	71
A.1	Kaaviokuva implementoidusta sekvenssistä	78
C.1	Rotan aivokartta koronaalisesta leikkeestä	82
D.1	d-PFG-värikartat yhden eläimen kaikista leikkeistä	83

TERMIT JA SYMBOLIT

μA	mikroskooppinen anisotropia (<i>microscopic anisotropy</i>)
aE	näennäinen eksentrisyys (<i>apparent eccentricity</i>)
ADC	näennäinen diffuusiovakio (<i>apparent diffusion coefficient</i>)
CC	aivokurkiainen (<i>corpus callosum</i>)
CSA	mikrorakenteen muodosta aiheutuva anisotropia (<i>compartment shape anisotropy</i>)
d-PFG	kahteen diffuusiogradienttipariin perustuva magneettikuvausmenetelmä (<i>double pulsed field gradient</i>)
DTI	diffuusiotensorikuvaus (<i>diffusion tensor imaging</i>)
DEC	suuntakoodattu värikartta (<i>direction encoded colormap</i>)
EA	mikrorakenteiden suuntautuneisuudesta aiheutuva anisotropia (<i>ensemble anisotropy</i>)
EPI	datankeräysmenetelmä, jossa jopa koko k-avaruus kerätään kerralla (<i>echo planar imaging</i>)
<i>ex vivo</i>	elävän organismin ulkopuolella, keinotekoisissa olosuhteissa
FA	osittainen anisotropia (<i>fractional anisotropy</i>)
FOV	kuva-ala (<i>field of view</i>)
GE	kenttäkaiku (<i>gradient echo</i>)
IC	sisäkotelo (<i>internal capsule</i>)
<i>in vivo</i>	elävässä organismissa
MRI	magneettikuvaus (<i>magnetic resonance imaging</i>)
NMR	ydinmagneettinen resonanssi (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
PFG	yhteen diffuusiogradienttipariin perustuva magneettikuvausmenetelmä (<i>pulsed field gradient</i>)
ROI	aivoista rajattu tarkasteltava alue (<i>region of interest</i>)
S1	primäärinen somatosensorinen korteksi (<i>primary somatosensory cortex</i>)
SE	spin-kaiku (<i>spin echo</i>)
SNR	signaali-kohinasuhde (<i>signal-to-noise ratio</i>)
VB	ventrobasaalinen kompleksi (<i>ventrobasal complex</i>)
α	poikkeutuskulma
γ	gyromagneettinen vakio

δ	diffuusiogradientin kesto
Δ	diffuusiogradienttien välinen aika diffuusiogradienttiparissa
ζ	viskoosi kitkakerroin
η	viskositeetti
ρ_P	protonitiheys
φ	residuaalivaihe
Ψ	diffuusiogradienttiparien välinen kulma kulmariippuvassa d-PFG-sekvenssissä
ω_0	Larmor-taajuus
a	rakenteen karakteristinen dimensio, esimerkiksi halkaisija tai pisin akseli
b	diffuusiopainotuksen voimakkuus
\mathbf{B}_0	ulkoinen magneettikenttä
c	merkkiaineen konsentraatio
D	diffuusiovakio
d_S	leikkeen paksuus
E_{norm}	normalisoitu signaalin voimakkuus kulmariippuvassa d-PFG-sekvenssissä
\mathbf{g}	diffuusiogradientin suunta ja voimakkuus
G_P	vaihegradientti
G_{RO}	lukugradientti
G_S	leikkeenvalintagradientti
$G_{x,y,z}$	gradientin voimakkuus x-, y-, tai z-suunnassa, vastaa- vasti
\mathbf{J}	diffuusiovuo
k_B	Boltzmannin vakio
\mathbf{k}	gradientin ensimmäinen momentti
\mathbf{M}	nettomagnetisaatio
\mathbf{M}_0	tasapainomagnetisaatio
\mathbf{M}_z	nettomagnetisaation z-komponentti
\mathbf{M}_{xy}	nettomagnetisaation xy-tason komponentti
n	diffuusioprosessin dimensionaalisuus
N^+	magneettikentän suuntaisesti suuntautuneiden spinien populaatio
N^-	magneettikentän vastaisesti suuntautuneiden spinien populaatio
N_A	kuvadatan keskiarvotusten lukumäärä

N_{dir}	diffuusiogradienttisuuntien lukumäärä
N_{DP}	datapisteiden lukumäärä
N_S	leikkeiden lukumäärä
\mathbf{R}	diffundoituneen hiukkasen siirtymävektori isotrooppi- sessä aineessa
\mathbf{r}_N	diffundoituneen hiukkasen siirtymävektori N :n askeleen jälkeen
S	magneettikuvaussignaalin voimakkuus
T_1	pitkittäisen relaksaation vaimenemisvakio
T_2	poikittaisen relaksaation vaimenemisvakio
T_2^*	poikittaisen relaksaation vaimenemisvakio, kun huo- mioidaan ulkoisen magneettikentän epähomogeenisuus
T_E	kaikuaika
T_{E_tot}	d-PFG-sekvenssin kokonaiskaikuaika
T_{E1}, T_{E2}	d-PFG-sekvenssin ensimmäisen ja toisen puolikkaan kai- kuajat, vastaavasti
T_R	toisto aika

1. JOHDANTO

Magneettikuvaus (MRI, *magnetic resonance imaging*) on neljän viime vuosikymmenen aikana kehittynyt suosituksi ja laajasti käytetyksi kuvantamismenetelmäksi, jonka vahvoja puolia ovat sen joustavuus, kajoamattomuus ja mahdollisuus tuottaa monenlaisia kontrasteja. Magneettikuvausmenetelmien kehittyminen esimerkiksi funktionaalisen kuvantamisen ja veden diffuusion kuvantamisen suhteen on laajentanut magneettikuvauksen avulla saatavaa informaatiota valtavasti. Esimerkiksi veden diffuusiokuvantamista voidaan hyödyntää aivojen valkean aineen hermoratakartoitukseen käyttämällä diffuusiotensorikuvausta (DTI, *diffusion tensor imaging*) (Hiltunen et al. 2007). Muita tärkeitä diffuusiokuvantamisen sovelluksia ovat muun muassa erilaisten neurodegeneratiivisten sairauksien – kuten esimerkiksi epilepsian ja akuutin aivohalvauksen – tutkimus ja havaitseminen jo niiden kehitysvaiheessa (Horsefield & Jones 2002).

DTI-menetelmä perustuu siihen, että biologinen kudoks on hyvin anisotrooppista ja rajoittaa siten veden diffuusiota eri suunnissa eri tavalla. Tällöin myös diffuusiolle herkeistetty MRI-signaali heikkenee anisotrooppisesti paikan funktiona, minkä avulla DTI-menetelmä määrittää kudoksen mikrorakenteiden muodon ja orientaation. Vaikka DTI on laajasti käytetty menetelmä ja saa aikaan voimakkaan kontrastin aivojen valkean ja harmaan aineen välille, sillä on myös heikkoutensa. DTI havaitsee anisotrooppisen diffuusion ja kykenee määrittämään tietoa mikrorakenteista vain alueilla, joissa rakenteet ovat vahvasti samansuuntaisia, kuten valkeassa aineessa. DTI:n heikkoudet alkavat näkyä sen sijaan kudoksissa, joissa mikrorakenteet risteävät toistensa yli ja koherenttia järjestyneisyyttä on vähän. Esimerkiksi harmaassa aineessa rakenteet ovat satunnaisemmin suuntautuneita ja niiden välillä on suurempia kokoeroja. Tämänäyttöisillä alueilla DTI-kontrasti keskiarvottuu ja kuvaa diffuusion olevan isotrooppista, vaikka kudoksessa olisikin mikroskooppisen tason anisotropiaa. (Mori & Zhang 2006)

Alunperin Coryn et al. (1990) esittelemä kahteen diffuusiogradienttipariin perustuva d-PFG-menetelmä (*double pulsed field gradient*) pyrkii vastaamaan tarpeeseen saada tietoa kudoksen mikrorakenteista alueilla, joilla DTI ei havaitse mikroskooppisen tason anisotropiaa. Aivan viime aikoina d-PFG:n kulmariippuvan version, jossa diffuusiogradienttiparien välistä kulmaa muutetaan pitäen gradienttien kesto ja voimakkuus vakiona, on osoitettu tuottavan kontrastiparametreja, joiden avulla saa-

daan luotua kontrastia myös esimerkiksi harmaan aineen alueille. Lisäksi menetelmän on osoitettu toimivan myös *in vivo* -olosuhteissa. (Shemesh et al. 2012) Sen tuottamien kontrastiparametrien todellista tarkoitusta ja vastaavuutta kudusrakenteiden ominaisuuksiin ei ole kuitenkaan vielä juurikaan tutkittu käytännössä.

Tämä diplomityö on tehty Itä-Suomen yliopiston A.I. Virtanen -instituutin biolääketieteellinen NMR -tutkimusryhmässä ja sen tavoitteena oli implementoida kulmariippuva d-PFG-sekvenssi tutkimusryhmän uusimmalle, *in vivo* -käytössä olevalle Bruker Pharmascan 7T -magneettikuvauslaitteelle sekä testata sekvenssin toimivuutta *in vivo* -olosuhteissa ja vertailla tuloksia aikaisempiin d-PFG-tuloksiin. Lisäksi työ pyrkii arvioimaan kulmariippuvan d-PFG-menetelmän tuottamien uusien kontrastiparametrien hyödyllisyyttä ja menetelmän toimivuutta vertailemalla sitä *in vivo* DTI-menetelmällä saatuihin tuloksiin.

Työ jakautuu kahteen osaan: kulmariippuvan d-PFG-sekvenssin implementointiin sekä varsinaisiin magneettikuvauslaitteilla tehtyihin mittauksiin. Teoriaosuuden jälkeen esitetään ensin toteutetun sekvenssin rakenne ja sekvenssin implementoinnissa tehdyt ohjelmointiratkaisut pääpiirteittään. Tämän jälkeen kuvaillaan varsinaisten mittausten toteutus sekä toteutetulla sekvenssillä että vertailukohtina toimivilla *in vivo* DTI- sekä *ex vivo* d-PFG -sekvensseillä. Tuloksia analysoidaan tulkitsemalla mittausdatasta muodostettuja värikarttoja kvalitatiivisesti ja värikartoista rajattuja alueita (ROI, *region of interest*) kvantitatiivisesti. Koska mittausparametreissa ja -olosuhteissa oli *in vivo* d-PFG:n ja DTI:n sekä *in vivo* ja *ex vivo* d-PFG:n välillä vertailukelpoisuutta heikentäviä eroja, pyrittiin ROI-alueiden kvantitatiivisessa vertailussa keskittymään lähinnä siihen, mitkä ovat suurimmat erot DTI:n ja d-PFG:n välillä ja että implementoidun sekvenssin tuottamat arvot ovat trendiltään samanlaisia kuin *ex vivo* d-PFG:n arvot.

2. MAGNEETTIKUVAUKSEN PERUSTEET

Magneettikuvausta pidetään eräänä 1900-luvun merkittävimmistä lääketieteen ja lääketieteellisen tekniikan saavutuksista, joka on mahdollistanut ihmisruumiin rakenteen ja toiminnan havainnoimisen uudella tasolla. Se on kudokseen kajoamaton tomografinen kuvantamismenetelmä, joka mahdollistaa hyvin monenlaisten kudosten erottamisen toisistaan kuvassa. Magneettikuvaus perustuu ydinmagneettiseen resonanssiin (NMR, *nuclear magnetic resonance*), joka havaittiin ensimmäisen kerran vuonna 1946. Ilmiön lääketieteellinen hyöty huomattiin 1970-luvulla, jonka jälkeen magneettikuvaus on kehittynyt luotettavaksi ja erittäin laajasti sekä kliinisessä että tutkimuskäytössä hyödynnettäväksi kuvantamismenetelmäksi. (McRobbie et al. 2007, s. 1) Tässä luvussa selvitetään ydinmagneettisen resonanssin ja magneettikuvauksen tärkeimmät perusteet, jotka luovat pohjan työn aiheen ymmärtämiselle.

2.1 Ydinmagneettinen resonanssi

2.1.1 Ilmiön fysikaalinen tausta

NMR-ilmiön taustalla on atomiytimen spin-ominaisuus. Spin on alkeishiukkasten perustason suure, kuten massa tai sähkövaraus ja se on luonteeltaan puhtaasti kvanttimekaaninen. Elektronit, protonit ja neutronit ovat fermioneja ja niiden spin voi olla joko $-1/2$ tai $1/2$ (Young & Freedman 2000, s. 1386). Kun protonit ja neutronit muodostavat atomeja, ne muodostavat Paulin kielto­säännön mukaan parin toisen spiniltään vastakkaismerkkisen protonin tai neutronin kanssa, vastaavasti. Spin aiheuttaa alkeishiukkaselle magneettisen dipolimomentin, jolloin alkeishiukkanen käyttäytyy kuin pieni magneetti. (Buxton 2002, s. 69) Tällöin, jos ytimessä on pariton määrä protoneja tai neutroneja eli ytimen massaluku on pariton, vastakkaisten spinien aiheuttamat magneettiset dipolimomentit eivät kumoudu, ja ytimellä on nettospinistä aiheutuva magneettinen dipolimomentti. Näitä ytimiä kutsutaan MRI-aktiivisiksi ytimiksi (esimerkiksi ^1H , ^{13}C tai ^{19}F) ja ulkoisessa magneettikentässä ne pyrkivät suuntaamaan magneettisen momenttinsa kentän suuntaisesti. Yleisin magneettikuvauksessa tarkasteltava ydin on ^1H , eli protoni, sillä se luo vahvan magneettisen dipolimomentin. Lisäksi vetyatomeja on biologisissa kudoksissa erittäin runsaasti, esimerkiksi vedessä ja rasvakudoksessa. (Westbrook et al. 2005, s. 4)

Koska myös atomiydin itse pyörii oman akselinsa ympäri, eivät spinit suuntaudu

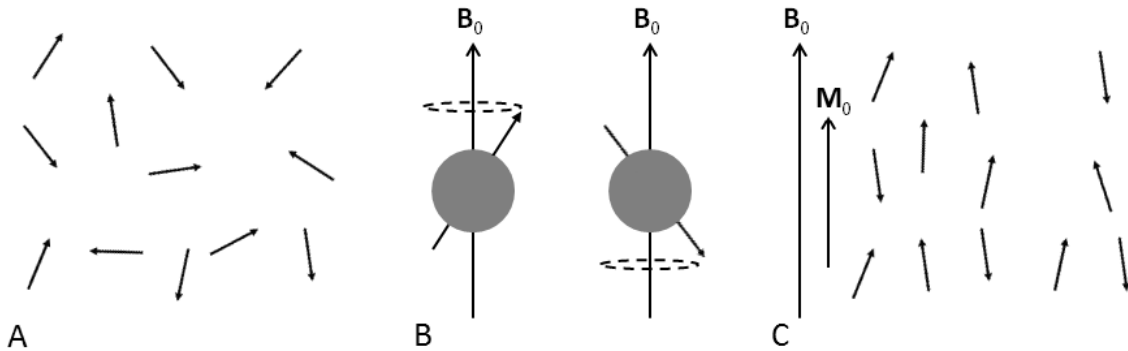
täysin ulkoisen kentän \mathbf{B}_0 suuntaiseksi, vaan prekessoivat kentän suunnan ympärillä taajuudella, jota kutsutaan Larmor-taajuudeksi

$$\omega_0 = \gamma B_0, \quad (2.1)$$

jossa γ on gyromagneettinen vakio ja esimerkiksi vedylle $\gamma = 42,58 \text{ MHz/T}$ (Buxton 2002, s. 71). Ilman ulkoista magneettikenttää vety-ytimien spinit ovat satunnaisesti suuntautuneita ja magneettiset dipolimomentit kumoavat toisensa (kuva 2.1 A). Kun ytimet altistetaan voimakkaalle ulkoiselle magneettikentälle \mathbf{B}_0 , tietty määrä ytimien spineistä pyrkii suuntautumaan kentän suuntaisesti (N^+) ja loput kentän vastaisesti (N^-) (kuva 2.1 B). Kentän suuntaisesti asettuvat spinit ovat alemmalla ja kenttää vastaan olevat ylemmällä energiatilalla. Spinien jakautuminen näihin kahteen populaatioon riippuu ytimien termisen energian määrästä ja noudattaa Boltzmannin jakaumaa

$$\frac{N^-}{N^+} = e^{-E/k_B T}, \quad (2.2)$$

jossa E on energiatilojen energioiden erotus, k_B on Boltzmannin vakio ja T absoluuttinen lämpötila. (McRobbie et al. 2007, s. 137-140)



Kuva 2.1: Nettomagnetisaation syntyminen. (A) Ilman ulkoista magneettikenttää ytimien magneettiset momentit ovat satunnaisesti suuntautuneita. (B) Ulkoisen magneettikentän \mathbf{B}_0 läsnäollessa yksittäisen ytimen magneettinen momentti prekessoi \mathbf{B}_0 :n ympäri joko sen suuntaisesti (vas.) tai sen vastaisesti. (C) Makroskooppisella tasolla ulkoinen kenttä suuntaa magneettiset momentit yhtälön (2.2) mukaisesti, mikä aiheuttaa nettomagnetisaation \mathbf{M}_0 .

Tarkastellaan seuraavaksi pientä makroskooppista tilavuutta, kuten kuutiosenttimetriä, joka sisältää tutkittavia ytimiä. Koska pienemmällä osalla spineistä on tarpeeksi energiaa suuntautuakseen kentän vastaisesti, syntyy termisessä tasapainossa tarkasteltavaan tilavuuteen tasapainomagnetisaatio \mathbf{M}_0 , joka on kentän \mathbf{B}_0 suuntainen (kuva 2.1 C). \mathbf{M}_0 on siis näytteeseen syntyvän nettodipolimomentin suuruus kuutiosenttimetriä kohden ja se on suoraan verrannollinen tilavuuden protonitiheyteen. (Buxton 2002, s. 72) Spinien prekessiosta johtuen magneettisilla dipolimomen-

teilla on myös \mathbf{B}_0 -kenttää vastaan kohtisuora komponentti, joka ei tasapainotilassa kuitenkaan näy nettomagnetisaatiossa, sillä spinien prekessio on satunnaisesti eri vaiheessa (Hoa 2009).

Ydin voi kääntää spininsä kentän vastaiseen suuntaan ja siten siirtyä korkeammalle energiatilalle, jos se absorboi energiakvantin, jonka taajuus vastaa ytimen Larmor-taajuutta (yhtälö 2.1). Tätä ilmiötä kutsutaan ydinmagneettiseksi resonanssiksi ja spinien siirtymistä ylemmälle energiatilalle kutsutaan virittymiseksi. (Westbrook et al. 2005, s. 10) Vedylle tarvittava taajuus on sähkömagneettisen spektrin radiotaajuusalueella ja resonanssiin vaadittava energia tuotetaan kelalla, jonka sisällä kulkeva vaihtovirta tuottaa magneettikenttään radiotaajuudella värähtelevän häiriön eli radiotaajuuspulssin (RF-pulssi, *radio frequency pulse*).

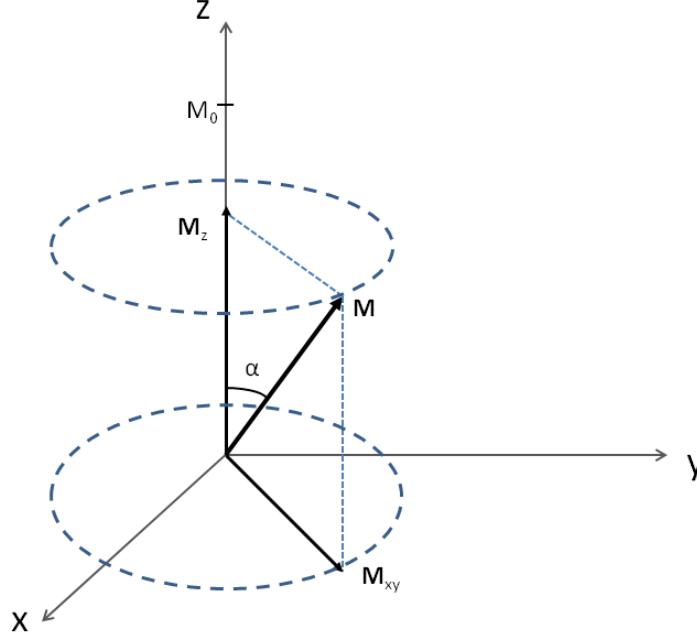
Koska kvantin energia riippuu sen taajuudesta ω yhtälön $E = h\omega$ mukaisesti, jossa h on Planckin vakio, voidaan yhtälössä (2.2) esiintyvä energiatilojen välinen erotus lausua myös magneettikentän voimakkuuden avulla käyttäen kvantin energiaa ja yhtälöä (2.1) (Hornak 2011):

$$E = h\gamma B_0. \quad (2.3)$$

Yhtälöistä (2.2) ja (2.3) havaitaan, että jos lämpötilaa ei voida kasvattaa, kuten esimerkiksi kliinisessä kuvantamisessa, ainoa tapa kasvattaa energiatilojen välistä suhdetta ja siten \mathbf{M}_0 :n suuruutta ja signaalin voimakkuutta on luoda tarpeeksi voimakas ulkoinen magneettikenttä (Westbrook et al. 2005, s. 6-7).

2.1.2 Relaksaatioajat ja signaalin syntyminen

Tasapainomagnetisaatio \mathbf{M}_0 osoittaa ulkoisen magneettikentän \mathbf{B}_0 suuntaan, joka perinteisessä NMR-koordinaatistossa määritellään z-suunnaksi (kuva 2.2). Kun systeemiin tuodaan Larmor-taajuuksinen pulssi, kvanttimekaanisesti tarkasteltuna osa spineistä saa tarpeeksi energiaa siirtyäkseen ylemmälle energiatasolle ja samalla spininit alkavat prekessoida koherentisti samassa vaiheessa, jolloin nettomagnetisaatiolle aiheutuu xy-tasossa Larmor-taajuudella prekessoiva komponentti \mathbf{M}_{xy} . Tämä aiheuttaa nettomagnetisaatiovektorin \mathbf{M} kallistumisen spiraalimaisessa liikkeessä pois päin z-akselista, jolloin nettomagnetisaation z-komponentti \mathbf{M}_z pienenee (kuva 2.2). Jos vektorin \mathbf{M} liikettä tarkastellaan z-akselin ympäri Larmor-taajuudella pyörivässä koordinaatistossa, \mathbf{M} kallistuu kohti xy-tasoa ja muodostaa z-akselin kanssa poikkeutuskulman α (*flip angle*), jonka suuruus riippuu radiotaajuuspulssin amplitudista ja kestosta. (Hoa 2009; McRobbie et al. 2007, s. 142) Pulseja kuvaillaan yleensä niiden tuottaman kallistuskulman mukaan, kuten 90° :n tai 180° :n pulssi. Esimerkiksi 90° :n pulssin jälkeen populaatiot N^+ ja N^- ovat yhtä suuret ja nettomagnetisaatio on kokonaan xy-tasossa. (Hoa 2009; Buxton 2002, s. 73)



Kuva 2.2: Poikkeutuskulma. Larmor-taajuuksinen pulssi saa osan spineistä virit-
tymään \mathbf{B}_0 -kentän vastaisiksi ja synkronoi spinit samaan vaiheeseen, jolloin net-
tomagnetisaatio \mathbf{M} kallistuu z -akselin tasapainoasemastaan poikkeutuskulmaan α .
Kun $\alpha = 90^\circ$, koko nettomagnetisaatio prekessoi xy -tasossa.

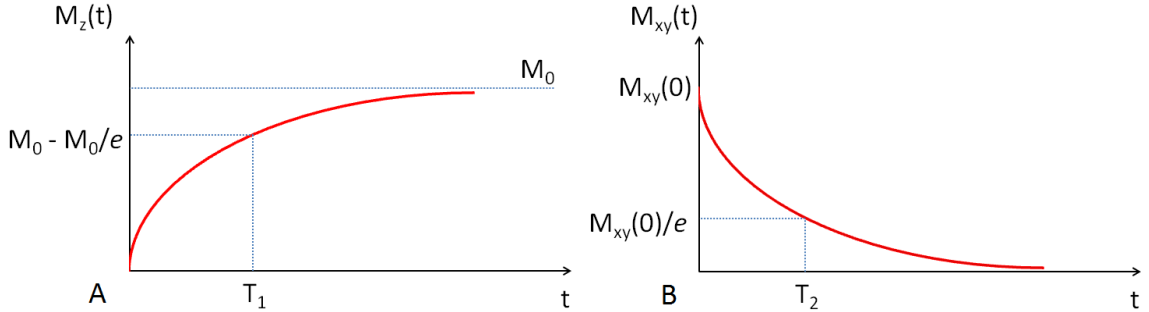
Radiotaajuuspulssi kasvattaa spin-systeemin energiaa, joten pulssin päätyttyä systeemi alkaa hakeutua uudelleen kohti termodynaamista tasapainotilaa. Osa spi-
neistä kääntyy jälleen \mathbf{B}_0 :n suuntaisiksi palaten alhaisemmalle energiatilalle ja emit-
toimalla energiaa ympäristöönsä. Tällöin pitkittäinen magnetisaatio M_z alkaa kas-
vaa kohti tasapainomagnetisaatiota M_0 . Lisäksi jokainen protoni kokee ulkoisen mag-
neettikentän hieman erilaisena ja muuttuvana johtuen lämpöliikkeestä ja naapuria-
tomien magneettikentistä, minkä takia prekessiotaajuuudet eroavat hieman ydinten
välillä. Tämä johtaa siihen, että paikalliset magnetisaatiovektorit joutuvat eri vai-
heisiin, jolloin nettomagnetisaation xy -komponentti M_{xy} pienenee ja lopulta häviää.
(McRobbie et al. 2007, s. 149) Matemaattisesti systeemin palautumista tasapaino-
tilaan voidaan kuvata ratkaisemalla Blochin yhtälöt M_z :lle ja M_{xy} :lle. Jos $M_z(0)$ ja
 $M_{xy}(0)$ ovat nettomagnetisaation komponenttien suuruudet heti pulssin päätyttyä,
ratkaisut ovat (Buxton 2002, s. 137-139)

$$M_z(t) = M_0 - (M_0 - M_z(0))e^{-t/T_1} \quad (2.4)$$

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{-t/T_2}. \quad (2.5)$$

Yhtälössä (2.4) aikaparametri T_1 kuvaa aikaa, jossa M_0 :n ja $M_z(0)$:n välinen ero-
tus pienenee tekijällä e (kuva 2.3 A). M_z :n palautumista kohti M_0 :aa kutsutaan
 T_1 -relaksaatioksi tai pitkittäiseksi relaksaatioksi ja se riippuu ulkoisen magneetti-

kentän voimakkuudesta. Yhtälössä (2.5) aikaparametri T_2 kuvaa aikaa, jossa M_{xy} pienenee alkuarvostaan tekijällä e (kuva 2.3 B). M_{xy} :n pienenemistä kohti nollaa kutsutaan T_2 -vaimenemiseksi tai poikittaiseksi relaksaatioksi. (Hoa 2009; Buxton 2002, s. 137-139)



Kuva 2.3: T_1 -relaksaatio ja T_2 -vaimeneminen. (A) T_1 -relaksaatiokuvaaja 90° :n pulssin tapauksessa, jolloin $M_z(0) = 0$. Hetkellä $t = T_1$ M_0 :n ja $M_z(0)$:n välinen erotus on pienentynyt tekijällä e . (B) T_2 -vaimenemiskuvaaja. Hetkellä $t = T_2$ xy -tason magnetisaatio on pienentynyt tekijällä e .

NMR-signaali syntyy, kun spinit ovat resonoineet ja nettomagnetisaatiovektorit prekessoivat Larmor-taajuudella xy -tasossa. Tällöin, kun magneettikenttään asetetaan kela, Faradayn induktiolain mukaan siihen indusoituu jännite, joka aiheuttaa sähköisen signaalin. Signaali on voimakkaimmillaan silloin, kun prekessoivat spinit ovat samassa vaiheessa ja M_{xy} maksimissaan, ja vaimenee eksponentiaalisesti sitä mukaa, kun spinit siirtyvät eri vaiheeseen. Tätä kutsutaan FID-signaaliksi (*free induction decay*). (Westbrook et al. 2005, s. 15-16) Näin ollen FID-signaali oskilloi myös Larmor-taajuudella. Käytännössä huomataan, että signaali heikkenee nopeammin, kuin yhtälö (2.5) ennustaa. Tämä johtuu ulkoisen magneettikentän staattisesta epähomogeenisuudesta, joka nopeuttaa spinien vaihedispersiota. Tällöin puhutaan T_2^* -vaimenemisesta ja vaimenemismakio $T_2^* < T_2$. (Hoa 2009)

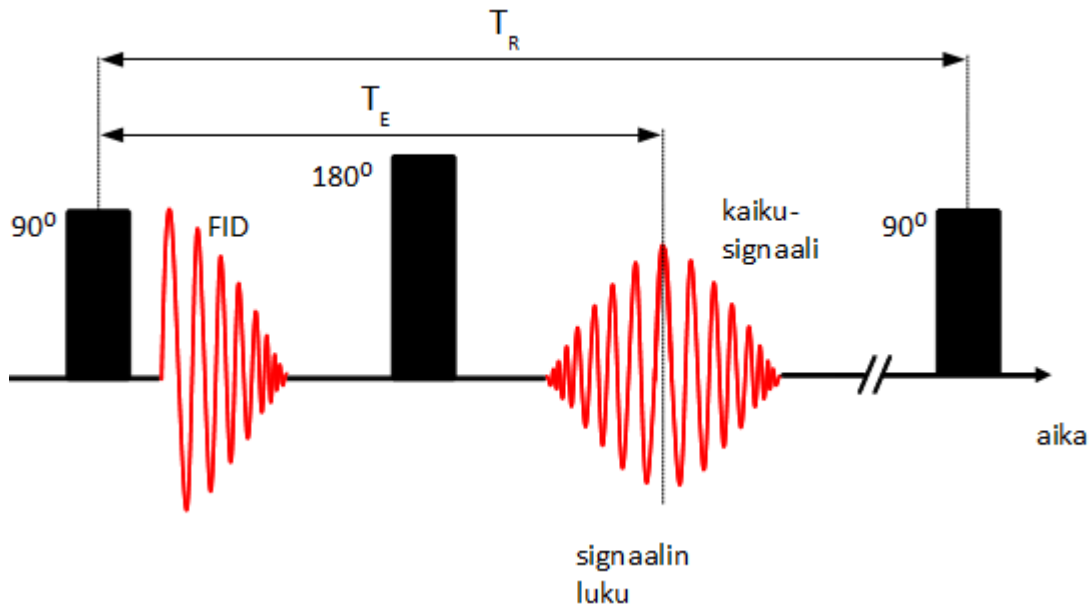
2.2 Kuvanmuodostus

2.2.1 Aikaparametrit ja kontrastin luominen

Lääketieteellisen kuvantamisen perusidea on kontrastin luominen erilaisten kudosten välille, jotta kuvasta voidaan erottaa yksityiskohtia. Magneettikuvaus on joustava kuvantamismenetelmä, jolla on mahdollista kuvantaa samaa anatomista rakennetta useilla erilaisilla kontrasteilla muuttamalla kuvantamisparametreja. Tämä on mahdollista, koska signaalin voimakkuuteen vaikuttava suure, eli poikittainen magnetisaatio M_{xy} , luodaan vasta itse kuvantamisprosessissa. (Buxton 2002, s. 66) Magneettikuvassa alueet, joilta saadaan voimakas signaali, näkyvät valkeina, ja alueet, joilta ei tule juuri lainkaan signaalia mustina. Näiden ääripäiden välillä olevat

voimakkuudet näkyvät harmaasävyinä (Westbrook et al. 2005, s. 22).

Poikittaisen magnetisaation syntymiseen ja määrään vaikutetaan pulssisarjoilla eli pulssisekvensseillä. Hyvin yksinkertainen MRI-pulssisekvenssi koostuu radiotaajuuspulssista, syntyvistä signaaleista ja niiden välissä olevista aikajaksoista. Näiden avulla määritellään pulssisekvenssiä kuvaavat perustason aikaparametrit. Nii-
tä ovat toisto aika (T_R , *repetition time*) ja kaikuaika (T_E , *echo time*) (kuva 2.4). Toisto aika T_R on aika, joka kuluu kahden peräkkäisen spinin virittävän radiotaajuuspulssin välillä. Koska T_R määrää kuinka paljon aikaa kuluu ennen kuin spinin virittyvät uudelleen, se määrää myös T_1 -relaksaation määrän sillä hetkellä kun signaali luetaan. Yleensä virityspulssin jälkeistä FID-signaalia ei lueta, vaan spinien T_2^* -vaihedispersio kumotaan joko 180° :n pulssilla tai gradienttien avulla (kappale 2.3), jolloin saadaan syntymään symmetrinen kaikusignaali, joka luetaan. Kaikuaika T_E on aika, joka kuluu virittävästä radiotaajuuspulssista kaikusignaalin maksimiin. Siten T_E määrää, paljonko xy-tason magnetisaatio ehtii heikentyä ja paljonko signaalissa on T_2 -vaimenemista sen lukuhetkellä. (Westbrook et al. 2005, s. 19-20)



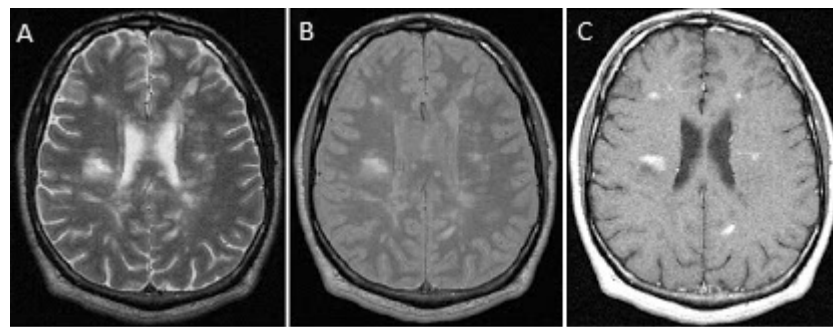
Kuva 2.4: Pulssisekvenssin aikaparametrit. Kaikuaika T_E määritellään yleisesti ajaksi virityspulssin ja kaikusignaalin maksimin välillä. Toisto aika T_R on kahden peräkkäisen virityspulssin välinen aika.

Magneettikuvaan saadaan kontrastia siksi, että eri kudosten signaaliin vaikuttavat sisäiset ominaisuudet, kuten protonitiheys sekä T_1 - ja T_2 -ajat, eroavat toisistaan. Näin ollen nettomagnetisaatio voidaan jakaa myös eri kudoksista aiheutuviin komponentteihin. Taulukosta 2.1 käy ilmi aivokudoksen eri osien eroja T_1 - ja T_2 -aikojen suhteen. Kuvan kontrastia voidaan muuttaa painottamalla tiettyä ku-

Taulukko 2.1: Aivokudoksen eri osien T_1 - ja T_2 -relaksaatioaikoja $1,5\ T$:n magneettikentässä (Hoa 2009).

	T_1 (ms)	T_2 (ms)
Vesi	3000	3000
Rasvakudos	240	85
Harmaa aine	810	100
Valkea aine	680	90

doksen sisäistä ominaisuutta muuttamalla ulkoisia parametreja, kuten T_E - ja T_R -aikoja tai poikkeutuskulmaa. Jos halutaan esimerkiksi kuva, jonka kontrasti riippuu kudoksen protonitiheydestä, säädetään T_E lyhyeksi, jolloin T_2 -vaimeneminen ei ehdi vielä vaikuttaa eri kudosten signaaleihin, ja toisaalta T_R pitkäksi, jolloin kudosten T_1 -relaksaatio ehtii tapahtua kokonaan. Näin ollen protonitiheys on hallitseva signaalin voimakkuuteen vaikuttava tekijä. Vastaavalla logiikalla kontrasti voidaan säätää T_1 - tai T_2 -painotetuksi. T_1 -painotus saadaan aikaiseksi asettamalla sekä T_E että T_R lyhyiksi ja poikkeutuskulma suureksi, siten, että T_R on lyhyempi kuin kudosten T_1 -ajat. Tällöin T_1 -relaksaatio ei ehdi tapahtua kokonaan, ja seuraavan virityspulssin xy-tasoon kääntämän magnetisaation voimakkuus eri kudoksissa riippuu T_1 -aikojen eroavaisuuksista, sillä T_2 -vaimenemista ei ehdi tapahtua. T_2 -painotuksen aikaansaamiseksi puolestaan sekä T_E - että T_R -aikaa pidennetään, jotta minimoidaan kudosten T_1 -riippuvuudesta aiheutuvat erot ja annetaan eron aiheutua kudosten T_2 -heikkenemisestä. (Westbrook et al. 2005, s. 23-31) Kudosten todelliset T_2 -riippuvuudet saadaan esiin vain kumoamalla ulkoisen kentän aiheuttama T_2^* -heikkeneminen. Muussa tapauksessa edellä mainittu T_2 -painotus tuottaa todellisuudessa T_2^* -painotettuja kuvia.



Kuva 2.5: Eri tavoin painotettuja magneettikuvia (Deb 2012): (A) T_2 -painotettu, (B) protonitiheyspainotettu ja (C) T_1 -painotettu kuva 30-vuotiaan miehen aivoista aksiaalisessa tasossa.

Kuvassa 2.5 on esimerkit samasta anatomisesta rakenteesta otetuista eri tavoin painotetuista magneettikuvista. Esimerkiksi paljon vettä sisältävät alueet, kuten kuvien keskellä sijaitsevat aivokammiot, näkyvät T_2 -painotetussa kuvassa (kuva 2.5

A) kirkkaina, sillä veden T_2 -aika on hyvin pitkä (taulukko 2.1), jolloin signaalin lukuhetkellä veden aiheuttama signaali on voimakas ja näkyy kuvassa vaaleana. Koska myös veden T_1 -aika on pitkä, sen aiheuttama signaali T_1 -painotetussa kuvassa (kuva 2.5 C) on pieni, sillä veden aiheuttama pitkittäinen magnetisaatio ei ehdi juurikaan palautua ennen seuraavaa virituspulssia.

2.2.2 Gradientit ja paikanmääritys

Magneettikuvauslaitteen kelaan indusoituva signaali on monen eri osasignaalin summa. Magneettikuvan aikaansaamiseksi tulee tietää, mistä kohtaa näytettä tietty osasignaali tulee, jotta tietylle pikselille voidaan määrittää oikea arvo. Kuvannettavat näytteet ovat kolmiulotteisia, joten pikselin arvon määrittävä signaali tulee rajata tiettyyn tilavuuteen x-, y- ja z-suunnissa. Tätä tilavuutta kutsutaan vokseliksi. Jos ulkoinen magneettikenttä on koko näytteen alueella sama, spinien resonanssi ei riipu niiden sijainnista. Tämän takia ulkoiseen kenttään tuotetaan lineaarisia gradientteja x-, y- ja z-suuntiin erillisillä gradienttikeloilla. Lineaarinen gradientti joko pienentää tai suurentaa spinien prekessiotaaajuutta gradientin suunnassa. Pistettä, jossa gradientit eivät vaikuta ulkoisen kentän arvoon kutsutaan magneetin isosentriksi. Gradienttikelojen napaisuus voidaan myös kääntää, jolloin gradientin vaikutussuunta on päinvastainen. (Hornak 2011; Buxton 2002, s. 89)

Perinteinen magneettikuva on näytteen poikkileikkaus halutussa tasossa, joten leikkeelle täytyy valita tietty paksuus kuvantamistasoa vastaan kohtisuorassa suunnassa. Tämä suunta valitaan esimerkiksi z-suunnaksi ja siihen käytettävää gradienttia kutsutaan leikkeenvalintagradientiksi (G_S , *slice selection gradient*). Se on z-suunnassa magneettikentän B_0 arvoa lineaarisesti paikan funktiona muuttava gradientti, jonka ansiosta myös spinien resonanssitaajuus ω muuttuu paikan funktiona yhtälön

$$\omega(z) = \gamma(B_0 + zG_z) = \omega_0 + \gamma zG_z \quad (2.6)$$

mukaisesti, jossa z on sijainti z-akselilla, G_z on z-akselin suuntaisen gradientin voimakkuus ja γ gyromagneettinen vakio. Kun tuotetaan tiettyjä taajuuksia sisältävä radiotaajuuspulssi leikkeenvalintagradientin ollessa päällä, saadaan vain halutulla välillä olevat spinit resonoimaan ja signaali rajattua z-suunnassa. Leikkeen paksuuteen vaikuttavia tekijöitä ovat gradientin voimakkuus ja radiotaajuuspulssin kaistanleveys. (Hornak 2011; Westbrook et al. 2005, s. 64-67) Koska leikkeenvalintagradientti aiheuttaa spinien vaihedispersiota leikkeenvalintagradientin suunnassa, täytyy sen jälkeen tuottaa vielä samalla gradienttikanavalla negatiivinen, eli vastakaissuuntainen gradientti, joka kumoaa spinien vaihedispersioon (Hashemi 2010, s. 163).

Leikkeenvalinnan jälkeen signaali koostuu leikkeen alueelta tulevasta signaalista,

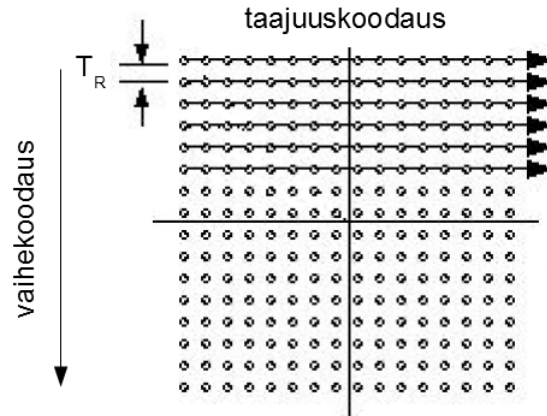
joka sisältää monia eri komponentteja, joiden amplitudit vaihtelevat, mutta kaikkien taajuus on sama leikkeen paksuuden asettamissa rajoissa. Jotta voidaan määrittää jokaista vokselia vastaava signaalin voimakkuus, täytyy signaalikomponentit paikantaa vielä kuvantamistasossa. Siihen liittyvät kaksi koordinaattia määritetään signaalin taajuuskoodauksella (*frequency encoding*) ja vaihekkoodauksella (*phase encoding*). Myös niiden toiminta perustuu yhtälössä (2.6) kuvattuun vaikutukseen, jonka ansiosta xy-tasossa prekessioivien magnetisaatiovektoreiden taajuudet saadaan riippumaan niiden sijainnista.

Vaihegradientti (G_P , *phase encoding gradient*) suunnataan esimerkiksi y-suuntaan, jolloin prekessiotajuus muuttuu y:n funktiona. Kun vaihegradientti otetaan pois päältä, prekessiotajuudet ovat jälleen samat, mutta vektoreilla on y:n funktiona muuttuva vaihekulma. (Hornak 2011) Muuttuva vaihekulma voidaan muuttaa niin sanotuksi pseudotajuudeksi, joka tarkoittaa tajuutta, jolla kertynyt vaihekulma kiertää täyden ympyrän vaihegradientin suunnassa edettäessä. Vaihegradientin voimakkuuden kasvaessa myös vaihekulman pseudotajuus kasvaa. Vaihegradientin jälkeen suunnataan vielä jäljelle jäävään suuntaan, esimerkiksi x-suuntaan, taajuusgradientti (G_F , *frequency encoding gradient*), joka saa magnetisaatiovektorit prekessioimaan eri tajuuksilla x-suunnassa. (Westbrook et al. 2005, s. 68-69, 88-89) Leikkeenvalinta-, vaihe- ja taajuusgradientit voidaan valita myös muilla tavoin kolmen pääakselin kesken, riippuen siitä, missä tasossa kuvan halutaan olevan. (Hornak 2011)

2.2.3 k-avaruudesta lopulliseen kuvaan

Taajuusgradientin ollessa päällä suoritetaan myös datan keräys signaalista, eli signaali muutetaan digitaaliseen muotoon ottamalla siitä näytteitä. Tämän takia taajuusgradienttia kutsutaan monesti myös lukugradientiksi (G_{RO} , *readout gradient*). Datapisteet kerätään matriisiin, jota kutsutaan k-avaruudeksi. Sen jokainen datapiste pitää sisällään informaatiota siitä, mikä on koko leikkeen alueelta tulevan signaalin taajuus ja vaihekulman pseudotajuus datapisteen tallennushetkellä. Edettäessä k-avaruuden rivien suunnassa, signaalin taajuus muuttuu, kun taas sarakkeiden suunnassa muuttuu vaihekulman pseudotajuus. Koska data kerätään vaihegradientin mentyä pois päältä ja taajuusgradientin ollessa päällä, täytyy datankeräys toistaa muuttaen vaihegradientin arvoa jokaisella toistolla ja pitämällä taajuusgradientti vakiona. Näin vaihekulman pseudotajuus saadaan muuttumaan k-avaruuden sarakkeiden suunnassa. (Hornak 2011; Westbrook et al. 2005, s. 89-90)

Näin ollen k-avaruuden matriisi on kaksiulotteinen signaali tajuustasossa ja koostuu yhtä monesta tajuus- ja pseudotajuuskomponentista, kuin tajuus- ja vaihesuunnissa on datapisteitä, vastaavasti. (Hornak 2011) Fourier-muunnos on matemaattinen menetelmä, jolla voidaan muuntaa signaali aikatasosta tajuustasoon



Kuva 2.6: Kaaviokuva k -avaruudesta (muokattu lähteestä Cohen 1998). Sen jokainen datapiste sisältää informaatiota xy -tason magnetisaatiovektoreiden taajuudesta, joka muuttuu rivien suunnassa, sekä vaihekulman pseudotaajuudesta, joka muuttuu sarakkeiden suunnassa. Yhden rivin sisältämä informaatio kerätään yhden T_R -jakson aikana.

tai päinvastoin. Koska MRI-signaali koostuu äärellisestä määrästä näytteitä, käytetään diskreettiä Fourier-muunnosta. (Bernstein et al. 2004, s. 5, 11) Siten signaali k -avaruudessa on alkuperäisen signaalin Fourier-muunnos ja ottamalla käänteinen kaksiulotteinen diskreetti Fourier-muunnos k -avaruuden taajuustason signaalista, saadaan selville signaalin eri taajuuskomponenttien amplitudit sekä vaihe- että taajuussuunnassa. Koska kutakin taajuuskomponenttia vastaava sijainti kummassakin suunnassa voidaan määrittää yhtälön (2.6) mukaisesti, saadaan muodostettua lopullinen kuva antamalla kyseisessä kohdassa sijaitsevalle pikselille taajuuskomponentin amplitudia vastaava harmaasävyarvo. (Hornak 2011)

2.2.4 Kuvanlaatu

Magneettikuvauksessa kuvanlaatua voidaan mitata muun muassa signaali-kohinasuhteen (SNR, *signal to noise ratio*) sekä avaruudellisen erottelukyvyn eli resoluution avulla. Yleensä näihin suureisiin vaikuttavien parametrien välillä joudutaan tekemään kompromisseja, jotta kuvanlaatu saadaan mahdollisimman hyväksi pitämällä kuvantamisaika silti mahdollisimman lyhyenä. Signaali-kohinasuhteella tarkoitetaan nimensä mukaisesti kuvan muodostavan signaalin suhdetta kohinaan. Signaali syntyy xy -tasossa prekessoivasta magnetisaatiosta, kun taas kohinalla tarkoitetaan satunnaisia taajuuksia, joita on kaikkialla avaruudessa. Magneettikuvaan kohinaa aiheuttaa muun muassa itse kuvannettava kohde sekä laitteiston sähköinen toiminta. Jotta kuva olisi mahdollisimman selkeä, pyritään signaali-kohinasuhde maksimoimaan. Lisäksi pyritään maksimoimaan kuvan resoluutio ja kontrasti, sillä ne vaikuttavat siihen, miten hyvin ja miten pieniä yksityiskohtia kuvasta voidaan erottaa. (Westbrook et al. 2005, s. 104-105)

Signaali-kohinasuhteeseen olennaisesti vaikuttavia parametreja ovat muun muassa laitteiston \mathbf{B}_0 -kentän voimakkuus, näytteen protonitiheys, vokselitilavuus, T_R , T_E , poikkeutuskulma sekä keskiarvotusten lukumäärä N_A . Ulkoisen \mathbf{B}_0 -kentän voimakkuus vaikuttaa spinien energiatilojen väliseen eroon (yhtälö 2.3), jolloin nettomagnetisaatiovektori kasvaa ja tuottaa voimakkaamman signaalin, ja luonnollisesti signaalin voimakkuus on suoraan sidoksissa myös näytteen protonitiheyteen. (Westbrook et al. 2005, s. 105-106)

Kuvainformaatio rakentuu näytteen tilavuusyksiköistä eli vokseleista tulevista signaaleista, joten mitä suurempi on vokselin tilavuus, sitä enemmän siihen mahtuu protoneja ja sitä voimakkaampi signaali siitä saadaan. Vokselin tilavuuteen voidaan vaikuttaa pikselikokoa tai leikkeen paksuutta muuttamalla. Vaikka vokselitilavuuden kasvattaminen parantaa signaali-kohinasuhdetta, se heikentää kuvan resoluutiota siinä ulottuvuudessa, jossa vokselin koko kasvaa, jolloin yksityiskohdat keskiarvottuvat vokseliin suuremmalta alueelta ja erotuskyky heikkenee. Ilmiön vaikutusta voidaan pienentää parantamalla kuvan resoluutiota, minkä aiheuttamaa signaali-kohinasuhteen heikkenemistä pitää puolestaan kompensoida keskiarvottamalla dataa enemmän eli lukemalla sama k-avaruuden vaakarivi tai segmentti useamman kerran ja ottamalla keskiarvo. (Westbrook et al. 2005, s. 106-107)

Kuvan resoluutio ilmoitetaan yhden pikselin kokona ja se saadaan jakamalla kuva-ala (FOV, *field of view*) k-avaruuden datapisteiden lukumäärällä. Näin ollen kuva-ala kannattaa pitää mahdollisimman pienenä ja datapisteiden määrä mahdollisimman suurena. Rajoittava tekijä on lähinnä se, että datapisteiden lisääminen kasvattaa kuvantamisaikaa. Lisäksi erotuskykyä voidaan parantaa leikkeen paksuuden suunnassa pienentämällä leikkeen paksuutta, mutta tämä pienentää myös signaali-kohinasuhdetta. (Westbrook et al. 2005, s. 106-109)

Myös ajoitusparametreilla T_R ja T_E on kontrastin lisäksi vaikutus signaali-kohinasuhteeseen. T_R määrää, kuinka paljon z-suuntainen magnetisaatio palautuu ennen kuin spinit viritetään uudelleen, joten pitkällä T_R -ajalla magnetisaatio ehtii palautua enemmän ja seuraavalla virityksellä xy-tasoon kääntyvä magnetisaatio ja siten myös signaali on voimakkaampi. T_E :n kasvattaminen sen sijaan heikentää signaali-kohinasuhdetta, sillä pitkä T_E antaa xy-tason magnetisaatiolle enemmän aikaa vaimentua. Näin ollen T_R tulisi pitää mahdollisimman pitkänä ja T_E mahdollisimman lyhyenä, niin että kuitenkin saadaan halutun tyyppinen kontrasti ja mahdollisimman lyhyt kuvantamisaika. (Westbrook et al. 2005, s. 110-120)

2.3 Yleisimmät pulssisekvenssit

Pulssisekvenssillä tarkoitetaan magneettikuvauksessa radiotaajuuspulssien, gradienttien ja niiden väliin jäävien ajanjaksojen muodostamaa sarjaa. Pulssisekvenssejä on lukuisia erilaisia ja erityyppisiin tilanteisiin tarkoitettuja ja niillä saadaan kuviin

erilaisia kontrasteja. (Westbrook et al. 2005, s. 144) Normaalisti xy-tason magnetisaation aiheuttamaa FID-signaalia ei lueta, vaan halutaan tuottaa datankeräysikkunaan keskitetty symmetrinen kaikusignaali. Pulssisekvenssit voidaan jakaa kahteen yleiseen pääryhmään sen mukaan, kuinka kaikusignaali tuotetaan. (Hornak 2011) Kummastakin päätyypistä on olemassa lukuisia muunnelmia, mutta seuraavassa tutustutaan kummankin päätyypin peruseräytyksiin.

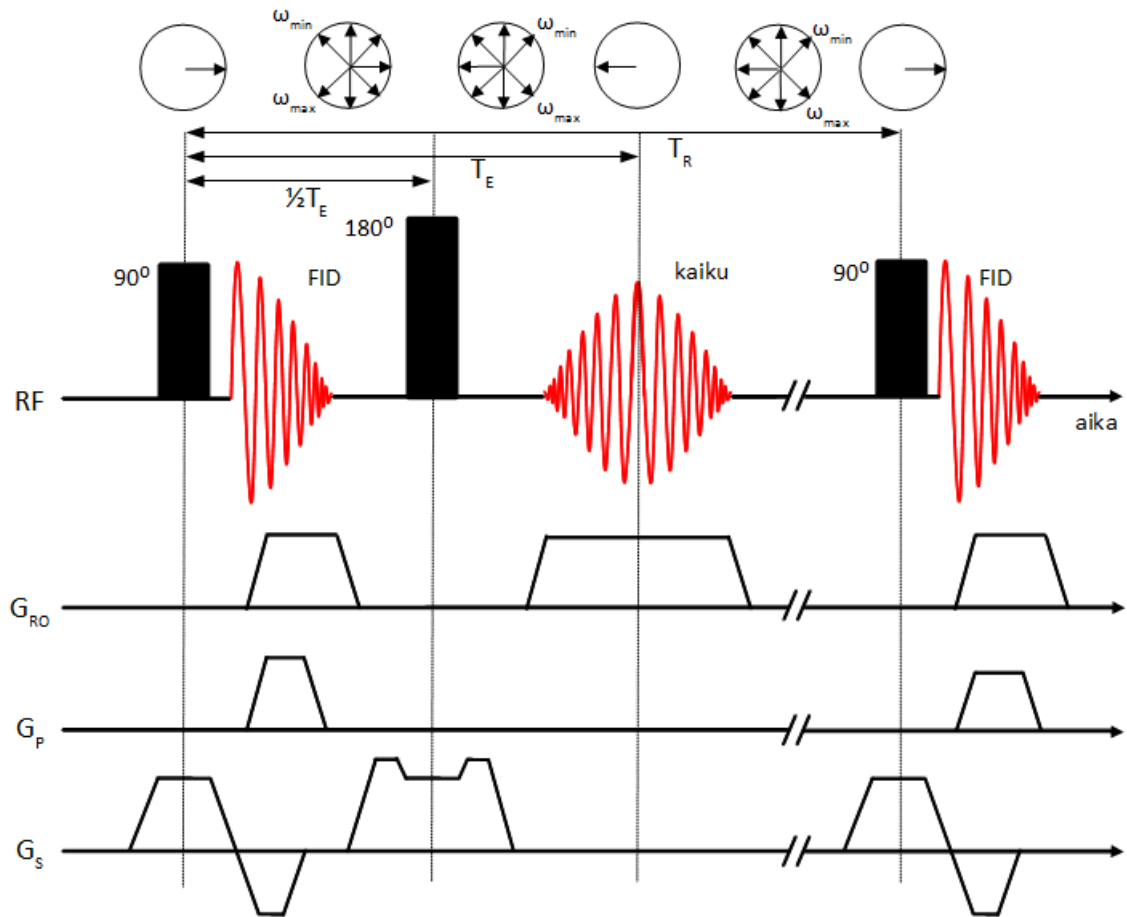
2.3.1 Spin-kaikuun pohjautuvat sekvenssit

Virityspulssin jälkeen xy-tasossa prekessoivat magnetisaatiovektorit alkavat poikittaisen relaksaation takia joutua eri vaiheisiin, jolloin vaihekulma nopeimpien ja hitaimpien spinien välillä kasvaa ja FID-signaali heikkenee. Tämä prosessi voidaan T_2^* -vaimenemisen osalta kääntää päinvastaiseksi 180° :n pulssin avulla. Se kääntää kaikki xy-tason magnetisaatiovektorit 180° saman xy-tason akselin suhteen, jolloin vektoreiden välinen vaihekulma alkaa jälleen pienentyä (kuva 2.7). Tällöin syntyy symmetrinen kaikusignaali, jonka huippukohta on hetkellä, kun vektorit ovat jälleen täsmälleen samassa vaiheessa. Spinien vaihedispersiota voidaan nopeuttaa FID-signaalin aikana tuottamalla lukugradientin G_{RO} kanssa samansuuntainen, mutta kestoltaan puolet lyhyempi gradientti (kuva 2.7). Tämä lyhentää sekvenssin kestoa ja ajoittaa spinien refokusoinnin lukugradientin puoliväliin. (McRobbie et al. 2007, 144-148)

Pulssisekvenssejä, joissa kaikusignaali tuotetaan 180° :n pulssilla, kutsutaan spin-kaikusekvensseiksi (SE, *spin echo*). Niissä spinien virityspulssina käytetään yleensä 90° :n pulssia ja 180° :n pulssia kutsutaan refokusointipulssiksi. Kaikuaika T_E määritellään 90° :n pulssista (yleensä sen puolivälistä) kaikusignaalin huippukohtaan. Tällöin viritys- ja refokusointipulssin sekä refokusointipulssin ja kaiun huippukohdan väliset ajat ovat molemmat $\frac{1}{2} T_E$ (kuva 2.7). (Westbrook et al. 2005, s. 38-42)

Spin-kaikusekvenssissä 180° :n refokusointipulssin molemmien puolien on kaksi identtistä lyhyttä gradienttia, yleensä leikkeenvalintagradientin suunnassa (kuva 2.7), joita kutsutaan crusher- tai spoiler-gradien-teiksi. Tämä johtuu siitä, että refokusointipulssi ei aina ole täydellinen, jolloin kallistuskulma $\alpha \neq 180^\circ$. Tällöin syntyy ylimääräinen M_{xy} -komponentti ja sen aiheuttama FID-signaali, joka häiritsee kaikusignaalia ja aiheuttaa kuvaan artefaktoja. Refokusointipulssin jälkeinen gradientti hävittää ylimääräisen FID-signaalin aiheuttamalla xy-tason vaihedispersion. Tämä aiheuttaa kuitenkin vaihedispersiota myös varsinaisen kaikusignaalin muodostaviin magnetisaatiovektoreihin, joten vaikutus täytyy tasapainottaa tuottamalla toinen, identtinen gradientti ennen refokusointipulssia. (Bernstein et al. 2004, s. 306-307)

Spin-kaikusekvenssin refokusointipulssilla pystytään kumoamaan magneettikentän staattisista epähomogeenisuuksista johtuva T_2^* -vaimeneminen, mutta ei varsinaista T_2 -vaimenemista, sillä se johtuu ytimien kokemista satunnaisista magneet-



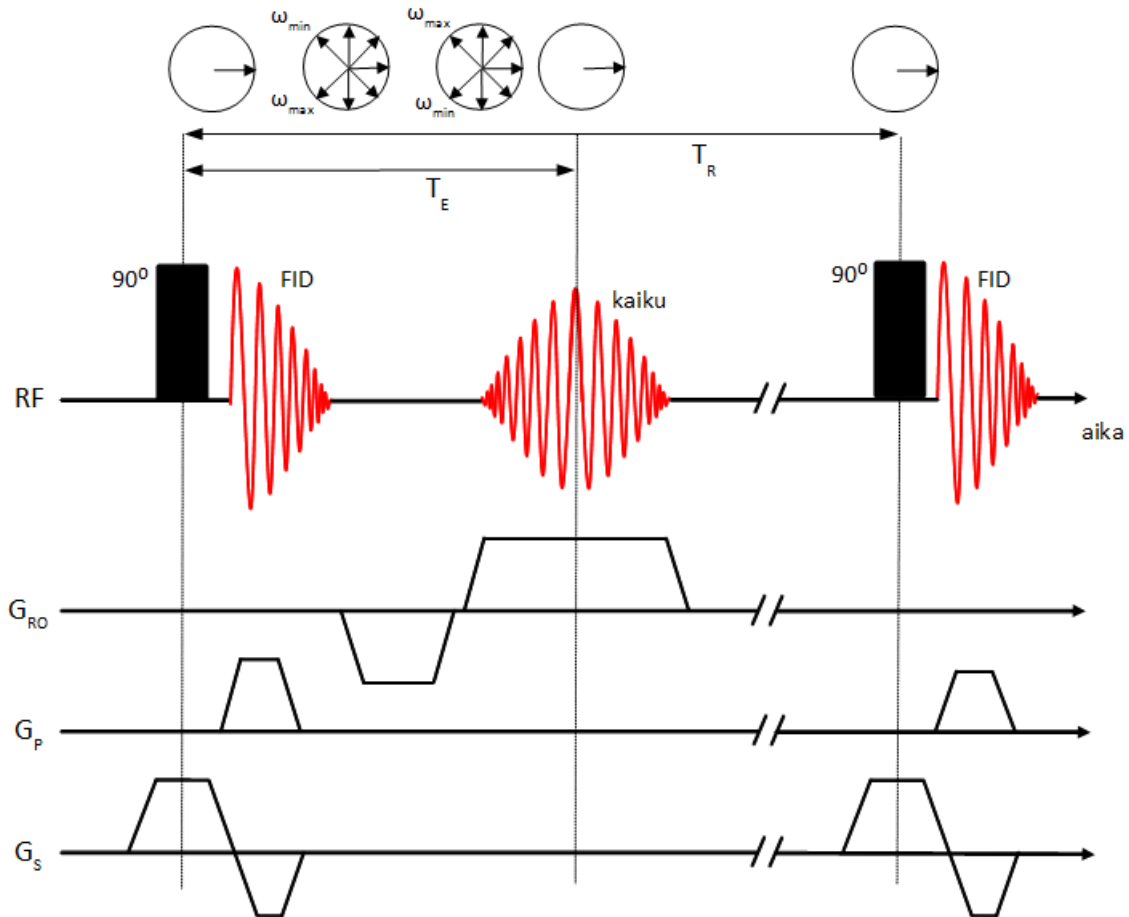
Kuva 2.7: Kaaviokuva spin-kaikusekvenssistä. 180° :n pulssi kumoaa FID-signaalin aikana tapahtuvan spinien vaihedispersiön kääntämällä niitä 180° , jolloin vaihekulma alkaa pienentyä ja lopulta spinit ovat jälleen samassa vaiheessa (ylärivi). G_S -kanavalla tuotetaan leikkeenvalintagradientit RF-pulssien aikana. FID-signaalin aikana tuotetaan vaihekoodausgradientti G_P -kanavalla, jonka arvo muuttuu jokaisella T_R -syklillä, sekä spinien vaihedispersiota nopeuttava gradientti G_{RO} -kanavalla. Kaikusignaalin aikana G_{RO} -kanavalla tuotetaan taajuusgradientti, jonka aikana signaali luetaan digitaaliseen muotoon.

tikentän fluktuaatioista. Näin ollen SE-sekvenssissä peräkkäisten FID- ja kaikusignaalien väliset huiput noudattavat eksponentiaalista T_2 -vaimenemista. (Hoa 2009)

2.3.2 Kenttäkaikuun pohjautuvat sekvenssit

Kaikusignaali voidaan tuottaa myös ilman 180° :n radiotaajuuspulssia, jolloin magnetisaatiovektorit refokusoidaan magneettikentän gradienttien avulla. Tämän tyyppiä pulssisekvenssejä kutsutaan kenttäkaikusekvensseiksi (GE, *gradient echo*). Kenttäkaikusekvenssissä tuotetaan juuri ennen taajuuskoodausgradienttia negatiivinen gradientti taajuuskoodaussuunnassa (kuva 2.8), jonka avulla kaikusignaali saadaan keskitettyä datankeräysikkunaan. Kun negatiivisen gradientin jälkeen tuotetaan var-

sinainen positiivinen taajuusgradientti, magnetisaatiovektoreiden väliset vaihekulmat alkavat jälleen pienentyä, jolloin syntyy kaikusignaali. Kaikusignaalin maksimi syntyy hetkellä, jolloin negatiivisen ja positiivisen taajuusgradientin aika-akselilta rajaamat pinta-alat ovat yhtä suuret (kuva 2.8). Myös kenttäkaikusignaalin T_E määrittellään ajaksi virituspulssista kaikusignaalin maksimiin. (Hornak 2011; Bernstein et al. 2004, s. 579).



Kuva 2.8: Kaaviokuva kenttäkaikusekvenssistä. Spin-kaiusta poiketen, kenttäkaikussa refokusointi tehdään ilman RF-pulssia. Tällöin ei kuitenkaan saada kumottua T_2^* -vaimenemista.

Kenttäkaikusekvensseissä käytetään yleensä alle 90° :n poikkeutuskulman tuottavaa virituspulssia, joka sallii lyhyemmän T_E :n ja T_R :n käytön, sillä relaksaatio tasapainomagnetisaatioon tapahtuu tällöin nopeammin. Kenttäkaikusekvenssit ovat muutenkin spinkaikusekvenssejä nopeampia, sillä magnetisaation refokusointi gradienttien avulla on nopeampaa kuin radiotaajuuspulssilla, minkä takia kenttäkaikusekvenssejä käytetään monesti nopeutta vaativissa tilanteissa. (Westbrook et al. 2005, s. 168-169; Bernstein et al. 2004, s. 579)

2.3.3 EPI-kuvantaminen

Koska perinteisessä signaalin taajuuskoodaussyklissä luetaan vain yksi k-avaruuden rivi T_R -jaksoa kohden, kuvantamisaika kasvaa helposti pitkäksi, sillä tyypillinen k-avaruuden matriisi sisältää esimerkiksi 128 tai 256 riviä ja normaalisti T_R -ajat ovat suuruusluokkaa 100 ms - 1 s. Varsinkin tilanteissa, joissa halutaan kuvantaa useampi leike ja yhtä kuvaa kohden keskiarvoistetaan useamman k-avaruuden arvoja, on kuvantamisaikaa usein tarpeen lyhentää käytännön syistä. Kuvantamisajan lyhentämiseksi on kehitetty menetelmiä, joissa k-avaruuteen kerätään useampia rivejä tai jopa koko k-avaruus yhden T_R -jakson aikana. Eräs tällainen menetelmä on EPI-kuvantaminen (*echo planar imaging*). (Westbrook et al. 2005, s. 191)

EPI-kuvantamisessa voidaan parhaimmillaan täyttää koko k-avaruus yhden T_R -jakson aikana. Tällöin ensimmäisen kaikusignaalin lukemisen ja positiivisen taajuusgradientin jälkeen vaihegradienttia kasvatetaan seuraavaan arvoon ja taajuusgradientti vaihdetaan negatiiviseksi, jolloin k-avaruuden ensimmäinen rivi täyttyy vasemmalta oikealle ja toinen rivi oikealta vasemmalle (kuva 2.9 A ja B). Toista riviä vastaavan kaikusignaalin luo vastakkaismerkkiseksi käännetty taajuusgradientti, samaan tapaan kuin edellä kuvatussa kenttäkaikusekvenssissä. Tätä sykliä voidaan toistaa niin monta kertaa kuin k-avaruuteen halutaan kerätä rivejä, jolloin oskilloiva taajuusgradientti luo rivien lukumäärää vastaavan kaikusignaalien jonon (*echo train*, kuva 2.9 A).

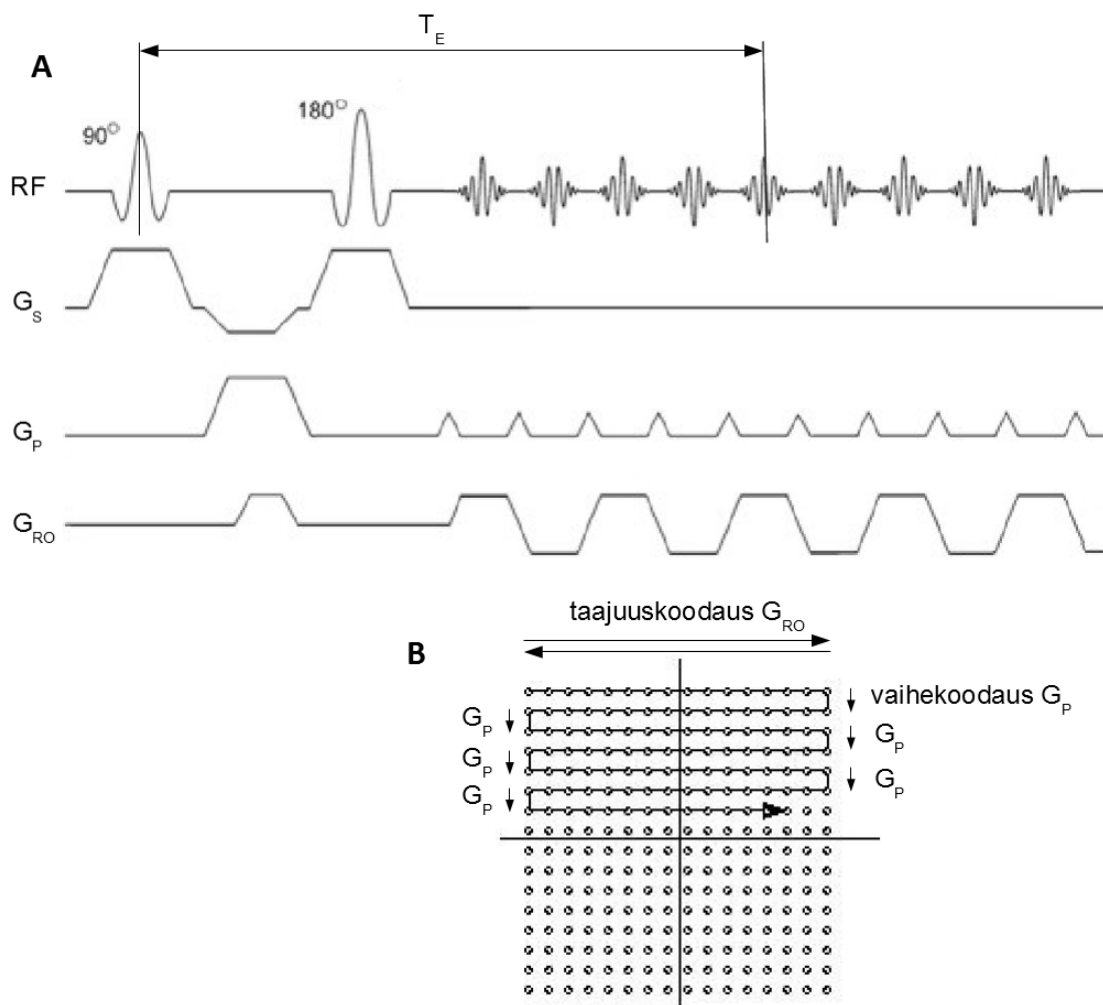
Koska kaikki kaiut pitää saada luettua ennen kuin signaali on vaimentunut liikaa, on EPI:n avulla tallennetussa kuvassa yleensä melko huono signaali-kohinasuhde. Lisäksi kaikkien kaikujen lukeminen kerralla pidentää lukuperiodia, joka aiheuttaa signaaliin enemmän T_2^* -vaimenemista. Sitä voidaan välttää tallentamalla kuvainformaatio k-avaruuteen useammassa segmentissä eri T_R -jaksojen aikana, jolloin yksittäisen lukujakson pituutta saadaan lyhennettyä. EPI on siis kuvainformaation tallennusmenetelmä ja sitä voidaan käyttää huolimatta siitä, miten ensimmäinen kaikusignaali on tuotettu. Täten se voidaan liittää erillisenä moduulina esimerkiksi spinkaikusekvenssiin (SE-EPI) tai kenttäkaikusekvenssiin (GE-EPI). (Westbrook et al. 2005, s. 192-193)

2.4 Magneettikuvauslaitteistot

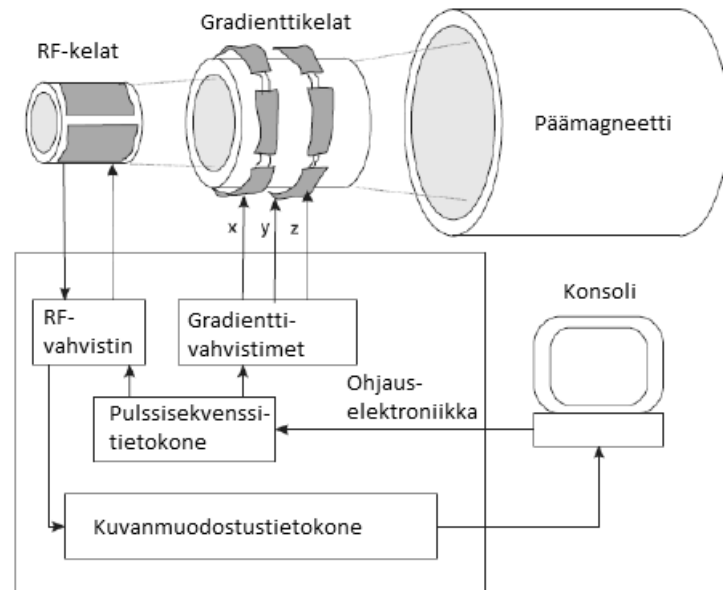
Magneettikuvauslaitteisto (kuva 2.10) koostuu ulkoisen magneettikentän luovan päämagneetin lisäksi sen sisällä olevista erityyppisistä keloista, kuten esimerkiksi kuvanmuodostuksessa ja diffuusiopainotuksessa tarvittavista gradienttikeloista, RF-pulsseja lähettävistä ja vastaanottavista RF-keloista sekä magneettikentän homogeenisuutta parantavista shim-keloista. Tämän lisäksi laitteisto vaatii suuren määrän ohjauselektroniikkaa, kuten gradientti- ja RF-vahvistimet sekä pulssisekvensse-

jä ja kuvanmuodostusta ohjaavat tietokoneyksiköt. Laitteen käyttäjä on yhteydessä laitteen toimintaan ohjauselektronikkaan kytketyn konsolin kautta. (Armoguum 2003)

Päämagneetteja on olemassa kolmea tyyppiä: kestmagneetteja, resistiivisiä sähkömagneetteja, sekä suprajohtavia sähkömagneetteja (Fishbein et al 2005, s. 14). Näistä suprajohtavat magneetit ovat nykyisin yleisin tyyppi, sillä niillä saavutetaan voimakas kenttä alhaisilla tehovaatimuksilla. Suprajohtavat kelat tehdään tavallisesti niobium-titaani-filamenteista, jotka ympäröidään kuparimatriisilla. Magneetti jäähdytetään kriittisen lämpötilan alle (NbTi-keloille alle 10 K) nestemäisellä heliумilla, jolloin se muuttuu suprajohtavaksi. (Armoguum 2003)



Kuva 2.9: Kaaviokuva spin-kaikusekvenssistä, jossa data kerätään EPI-menetelmällä (muokattu lähteistä Emory University 2005 (A) ja Cohen 1998 (B)). Kaikusignaalien aikana lukugradientti oskilloi positiivisen ja negatiivisen välillä, jolloin k -avaruuden rivi täyttyy vasemmalta oikealle tai päinvastoin, vastaavasti. Kaikujen välissä tehdään lyhyt vaihekoodaus, joka vaihtaa k -avaruuden riviä. Kaikuaika T_E määritellään EPI-sekvenssissä ajaksi virituspulssista keskimmäisen kaikusignaalin huippuun.



Kuva 2.10: Magneettikuvauslaitteiston rakenne (muokattu lähteestä Wang 2013). Laitteiston käyttäjä antaa komentoja konsolilta, jotka ohjaavat ohjauselektronikkaa, joka puolestaan ohjaa magneettikuvauslaitteen keloja. Vastaanottokelaan indusoitunut signaali vahvistetaan RF-vahvistimessa ja kuvanmuodostustietokone muodostaa siitä kuvan konsolille.

Päämagneetin sisällä sijaitsevat gradienttikelat, joiden avulla magneettikenttään luodaan lineaarisesti muuttuvia gradientteja. Niiden avulla signaali voidaan esimerkiksi paikantaa avaruudellisesti tai saada riippumaan veden diffuusiosta. Gradienttien voimakkuus on kehittynyt magneettikuvauksen alkua ajoista huomattavasti, mikä on muun muassa mahdollistanut kuvausmenetelmien kehittymisen nopeammiksi (Conolly 2007). Gradienttikelat on kytketty gradienttivahvistimien välityksellä pulssisekvenssietietokoneeseen, joka ohjaa niiden voimakkuutta ja muuttumista oikealla hetkellä pulssisekvenssin aikana. Gradienttien nopea vaihtuminen aiheuttaa laitteiston komponentteihin pyörrevirtoja, jotka muuttavat gradientin kokonaisvaikutusta ja aiheuttavat kuviin artefakteja. Pyörrevirtojen vaikutuksia voidaan pienentää ennakoimalla niiden vaikutuksia gradienttipulsseissa sekä korjaamalla kuvia jälkikäteen korjausalgoritmeilla. Lisäksi gradienttikeloja voidaan suojata pyörrevirroilta aktiivisilla suojausmenetelmillä. Moderneissa magneettikuvauslaitteistoissa on lisäksi päämagneetin ja gradienttikelojen välissä niin sanotut shim-kelat, joiden avulla magneettikenttä säädetään mahdollisimman homogeeniseksi. Hyvän kuvanlaadun saavuttamiseksi epähomogeenisuuksien tulisi olla alle 3.5 ppm kuvannettavassa tilavuudessa, mutta pelkän päämagneetin tuottaman kentän epähomogeenisuudet ovat usein luokkaa 1000 ppm. (Armoguum 2003) Shim-keloja on magneetin sisällä useita erilaisia, jotka vastaavat erimuotoisia kenttiä. Uudemmissa laitteissa niiden säätö tapahtuu automaattisesti, mutta vanhemmissa laitteissa säätäminen on käyttäjän

vastuulla.

Lähimpänä kuvantamiskohdetta magneettikuvauslaitteessa ovat RF-kelat, jotka tuottavat \mathbf{B}_0 -kenttään radiotaajuudella värähtelevän toisen magneettikentän, eli RF-pulssin. Sama kela voi toimia sekä lähetin- että vastaanottokelana (*transceiver coil*) tai lähetin ja vastaanotin voivat olla eri kelat (*transmitter/reciever coil*). Jälkimmäisessä konfiguraatiossa voidaan päästä lähemmäs kuvantamiskohteen pintaa esimerkiksi käyttämällä pintaa myötäilevää pintakelaa, jolloin kuvan kohinan määrää saadaan vähennettyä. Kelaa, joka ei ole kiinni kohteen pinnassa puolestaan kutsutaan volyymikelaksi. Nykyään monet kelat ovat tyypiltään kvadratuurikeloja. Ne sisältävät vähintään kaksi toisiaan vastaan kohtisuorassa olevaa silmukkaa, jotka tuottavat yhteen silmukkaan nähden $\sqrt{2}$ -kertaisen signaalin. (Armoguum 2003; Blink 2010) Lisäksi kliinisissä laitteistoissa käytetään nykyään yleisesti usean kanavan rinnakkaiskuvantamiskeloja (*parallel imaging*), joiden avulla saavutetaan esimerkiksi sama resoluutio lyhyemmällä kuvausajalla (McRobbie et al. 2007, s. 76). Vastaanottokelaan indusoitunut signaali vahvistetaan RF-vahvistimessa, jonka jälkeen se muutetaan digitaaliseen muotoon ja kuvanmuodostustietokone muodostaa siitä kuvan käyttäjän konsolille.

3. DIFFUUSIO JA MAGNEETTIKUVAUS

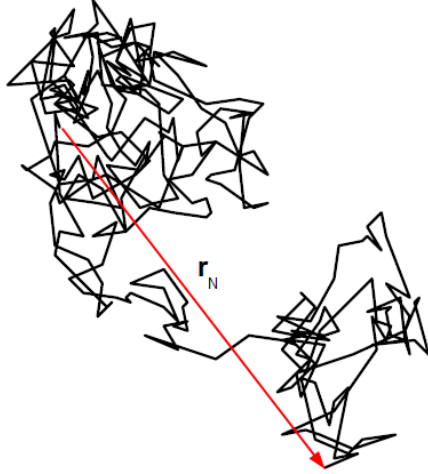
Perinteisen anatomisen kuvantamisen lisäksi magneettikuvausta voidaan käyttää havaitsemaan myös kudosten vesimolekyylien diffuusiota. MRI-signaali voidaan hermistää diffuusiolle siten, että signaalin vaimenemisesta voidaan määrittää diffuusion voimakkuus tietyssä suunnassa. Tätä varten on kehitetty erilaisia menetelmiä, joiden avulla voidaan päätellä esimerkiksi aivojen rakenteiden muotoja ja orientaatioita. Eräs näistä menetelmistä on diffuusiotensorikuvantaminen, joka toimii hyvin etenkin aivojen valkean aineen rakenteen karakterisoinnissa (Mori & Zhang 2006). Sillä ei kuitenkaan saada riittävästi kontrastia aivojen harmaan aineen alueille. Tässä diplomityössä testataan uutta, kahteen diffuusiogradienttipariin perustuvaa diffuusiokuvantamismenetelmää, jonka avulla kontrastia on mahdollista saada myös harmaan aineen alueille. (Shemesh et al. 2010, 2012) Tässä luvussa tutustutaan diffuusion fysikaalisiin perusteisiin ja siihen, miten MRI-signaali saadaan rippumaan diffuusiosta. Lisäksi tutustutaan kahteen edellä mainittun diffuusiokuvantamismenetelmään ja niiden eroihin.

3.1 Yleistä diffuusiosta

Diffuusio on fysikaalinen ilmiö, joka aiheutuu molekyylien niin sanotusta Brownin liikkeestä, eli molekyylien lämpöliikkeestä johtuvan satunnaisen törmäilyn aiheuttamasta liikkeestä. Kahden aineen sekoituessa toisiinsa, diffuusio aiheuttaa konsentraatiogradienttien tasaantumista. Toinen näkökulma diffuusioon on esimerkiksi yksittäisten vesimolekyylien diffuusion tarkasteleminen vedessä, jolloin puhutaan itseisdiffuusiosta (*self-diffusion*). Brownin liikkeen satunnaisuuden ja molekyylien suuren määrän takia yksittäisten molekyylien poikkeamasta tai suunnasta ei voida sanoa mitään, mutta tarkastelemalla suuria molekyylijoukkoja diffuusiolle voidaan johtaa tilastollisia suureita, joiden avulla voidaan tarkastella esimerkiksi keskimääräistä poikkeamaa tai tietynsuuruisen poikkeaman todennäköisyyttä. (Wheeler-Kingshott et al. 2003; Nelson 2002, s. 100)

3.1.1 Satunnaiskävelymalli

Tarkastelemalla Brownin liikettä yksittäisen molekyylin kannalta, diffuusiota voidaan mallintaa satunnaiskävelyn (*random walk*) avulla, jossa molekyyli ottaa N



Kuva 3.1: Molekyylin liikettä diffuusiassa voidaan mallintaa satunnaiskävelymallin avulla, jossa molekyyli ottaa N askelta satunnaisiin suuntiin. Molekyylin alku- ja loppupisteen välistä etäisyyttä merkitään vektorilla \mathbf{r}_N . Kuvassa tietokonesimulaatio, jossa $N = 7500$ ja molekyylin paikka on tallennettu 25 askeleen välein (muokattu lähteestä Nelson 2002, s. 102).

kappaletta L :n pituisia askeleita satunnaisiin suuntiin tasaisin aikavälein Δt (kuva 3.1). Satunnaisuuden takia molekyylin keskimääräinen siirtymä on nolla, mutta siirtymän \mathbf{r}_N neliölle voidaan laskea keskiarvo ja sen voidaan osoittaa olevan

$$\langle \mathbf{r}_N^2 \rangle \propto NL^2. \quad (3.1)$$

Askelten lukumäärä $N = t/\Delta t$, joten määrittelemällä diffuusiovakio $D = L^2/2n\Delta t$, jossa n on prosessin dimensionaalisuus, saadaan poikkeaman neliön keskiarvolle aikariippuvuus

$$\langle \mathbf{r}_N^2 \rangle = 2nDt. \quad (3.2)$$

Siten satunnaiskävelymallin avulla saadaan aikaskaala suuruusluokan $\sqrt{\langle \mathbf{r}_N^2 \rangle}$ siirtymille ja diffuusiovakio D kuvaa diffuusion voimakkuutta. (Nelson 2002, 101-104)

Koska Brownin liike voimistuu lämpötilan kasvaessa, on diffuusiokin voimakkaampaa korkeammissa lämpötiloissa. Toisaalta diffuusion voimakkuus riippuu myös aineen viskoosista kitkakertoimesta, joka pallomaiselle molekyylille saadaan Stokesin yhtälöstä $\zeta = 6\pi\eta r$, jossa η on aineen viskositeetti ja r molekyylin säde. Einstein yhdisti tämän käyttäytymisen yhdeksi relaatioksi

$$\zeta D = k_B T \quad \Leftrightarrow \quad D = \frac{k_B T}{\zeta} = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}, \quad (3.3)$$

jossa k_B on Boltzmannin vakio ja T lämpötila kelvineinä. Kasvava lämpötila siis voimistaa diffuusiota, mutta suuri viskositeetti tai molekyylin koko vaimentaa sitä. (Nelson 2002, s. 108)

3.1.2 Fickin lait ja todennäköisyystarkastelu

Jos tarkastellaan esimerkiksi jonkin tietyn merkkiaineen diffuusiota vedessä, huomataan, että ajan myötä aineen konsentraatioprofiili tasoittuu isotrooppiseksi. Tämä on seurausta systeemin entropian maksimoitumisesta, sillä tiloja, joissa hiukkaset ovat tasaisesti jakautuneet tarkasteltavaan tilavuuteen, on ylivoimaisen paljon verrattuna tiloihin, joissa merkkiainemolekyylit ovat keskittyneet pieneen tilaan systeemisä. Konsentraation tasoittuminen aiheuttaa diffuusiovuon \mathbf{J} , jonka suuruus Fickin ensimmäisen diffuusiolain mukaan voidaan yhdessä ulottuvuudessa määritellä

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x}, \quad (3.4)$$

jossa c on merkkiaineen konsentraatio. (Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 206) Diffuusion nopeus riippuu siis konsentraatiogradientin voimakkuudesta ja negatiivinen etumerkki tarkoittaa, että sen suunta on korkeammasta pitoisuudesta matalampaan.

Koska konsentraation aikakehitys ja vuon paikkakehitys ovat yhteydessä yhtälön $\partial c / \partial t = -\partial J / \partial x$ mukaisesti, voidaan tämän ja yhtälön (3.4) avulla johtaa Fickin toinen diffuusiolaki

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}, \quad (3.5)$$

joka yhdistää konsentraatioprofiilin aika- ja paikkakehityksen samaan yhtälöön. Yhtälöä (3.4) johdettaessa tulee tehdä oletus, että D :n arvo ei ole paikasta riippuva. Fickin toinen diffuusiolaki voidaan yleistää kolmeen ulottuvuuteen yhtälön

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right) = D \nabla^2 c \quad (3.6)$$

mukaisesti, mikäli diffuusio on isotrooppista, eli se ei suosi mitään tiettyä suuntaa. (Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 206)

Tarkasteltaessa itseisdiffuusiota, diffuusioprosessia voidaan kuvata sen todennäköisyyden avulla, jolla molekyyli löydetään tietyssä paikasta tietyllä hetkellä. Propagaattori $P(\mathbf{r}' | \mathbf{r}'')$ kuvaa todennäköisyyttä löytää alunperin pisteessä \mathbf{r}' ollut molekyyli pisteestä \mathbf{r}'' hetkellä t . Isotrooppisen diffuusion tapauksessa todennäköisyys ei riipu hiukkasen alkupisteestä, jolloin kaikkiin molekyyleihin voidaan soveltaa todennäköisyyttä $P(\mathbf{R}, t)$, jossa $\mathbf{R} = \mathbf{r}'' - \mathbf{r}'$. (Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 207)

Isotrooppiselle diffuusiolle todennäköisyyden voidaan osoittaa noudattavan Gaussin jakaumaa

$$P(\mathbf{R}, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\mathbf{R}^2 / 4Dt}. \quad (3.7)$$

Kun tarkastellaan itseisdiffuusiota molekyyliden löytymistodennäköisyyksien kautta,

Fickin toinen diffuusiolaki voidaan kirjoittaa todennäköisyyksille analogisesti yhtälön (3.6) kanssa

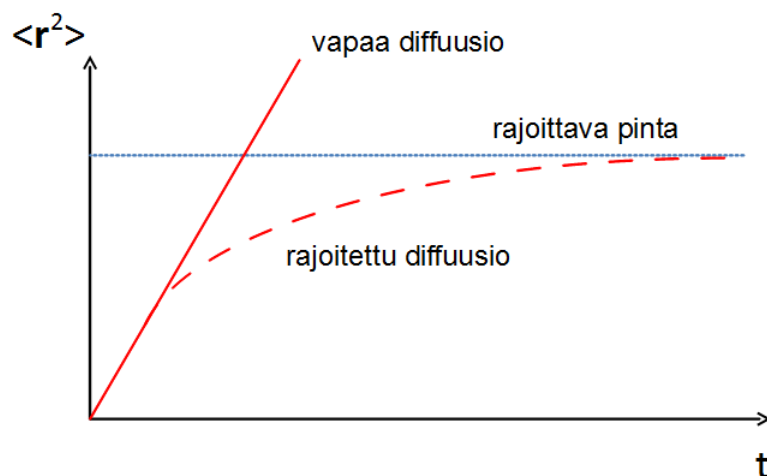
$$\frac{\partial P}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 P}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 P}{\partial z^2} \right) = D \nabla^2 P. \quad (3.8)$$

Näin ollen Fickin diffuusiolait pätevät myös molekyylien itseisdifфуusiolle, joka on se diffuusion muoto, jota diffuusiopainotetussa magneettikuvauksessa tarkastellaan. (Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 208)

3.2 Diffuusio aivojen rakenteissa

3.2.1 Näennäinen diffuusiovakio

Diffuusio homogeenisessä nesteessä on isotrooppista eli suunnasta riippumatonta. Tällöin myös diffuusiovakion arvo on sama joka suuntaan, eikä se riipu ajasta. Biologisissa kudoksissa tilanne on kuitenkin hyvin erilainen, sillä diffundoituvien vesimolekyylien liikettä rajoittavat monenlaiset esteet, kuten solukalvot ja makromolekyylit, ja niiden muodot ja orientaatiot riippuvat voimakkaasti kudostyyppistä ja molekulaarisesta ympäristöstä. (Hiltunen et al. 2007; Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 218)



Kuva 3.2: Vapaassa diffuusiossa verrannollisuus $\langle \mathbf{r}^2 \rangle$:n ja ajan välillä on lineaarinen. Rajoitetussa diffuusiossa $\langle \mathbf{r}^2 \rangle$ saavuttaa tietyn ajan jälkeen maksimiarvonsa, kun tarpeeksi suuri osa molekyyleistä on ehtinyt diffundoitua rajoittavalle pinnalle.

Esteet voivat rajoittaa diffuusiota kokonaan tai osittain, jolloin diffuusiovakio D eroaa vapaan isotrooppisen diffuusion tapauksesta ja sitä kutsutaan näennäiseksi diffuusiovakioksi (ADC, *apparent diffusion constant*). Tarkasteltaessa molekyylien diffuusiota biologisissa kudoksissa tarpeeksi kauan, yhä useampi molekyyli ehtii diffundoitua rajoittavalle pinnalle. Tällöin verrannollisuus $\langle \mathbf{r}^2 \rangle$:n ja ajan välillä ei ole enää lineaarinen (kuva 3.2) ja siten myös diffuusiovakion arvo riippuu ajasta ja

tarkasteltavasta suunnasta. (Mori & Zhang 2006; Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 219) Tämän takia tarkasteltaessa veden itseisdiffuusiota biologisissa kudoksissa on mielekkäämpää puhua näennäisestä diffuusiovakiosta, ja tästä eteenpäin tässä työssä D viittaa näennäiseen diffuusiovakioon.

3.2.2 Diffuusiotensori

Diffuusiota rajoittavat esteet voivat olla kudostyyppistä riippuen joko satunnaisesti tai koherentisti orientoituneita, joten molekyylien mahdollisuudet diffundoitua eri suunnissa ovat erilaiset. Diffuusion riippuessa suunnasta puhutaan anisotrooppisesta diffuusiosta ja tällöin kappaleessa 3.1.2 johdetut Fickin lait eivät ole enää voimassa, sillä ne johdettiin isotrooppiselle diffuusiolle. Molekyylien diffuusiota anisotrooppisessa väliaineessa voidaan kuvata parhaiten diffuusiotensorilla \mathbf{D} . Olettamalla molekyylien siirtymien noudattavan edelleen moniulotteista Gaussin jakaumaa havainnointiajan puitteissa, diffuusiotensori voidaan muodostaa 3x3-matriisina:

$$\mathbf{D} = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{pmatrix}. \quad (3.9)$$

Diffuusiovakion tensorikuvauksessa \mathbf{D} :n diagonaalialkiot kuvaavat diffuusiota koordinaattiakselien suunnassa ja muut D_{ij} -termit kuvaavat i -suuntaisen konsentraatiogradientin tai todennäköisyysjakauman vaikutusta diffuusiovuohon suunnassa j , kun $i, j = x, y, z$. (Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 207)

Olettamalla diffuusiotensorin komponentit vakioiksi, voidaan Fickin toinen diffuusiolaki (yhtälöt 3.6 ja 3.8) laajentaa anisotrooppisen diffuusion tapaukseen

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \sum_{i,j} D_{ij} \frac{\partial^2 C}{\partial i \partial j} = \sum_{i,j} D_{ij} \frac{\partial^2 P}{\partial i \partial j}, \quad (3.10)$$

jossa $i, j = x, y, z$. (Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 207)

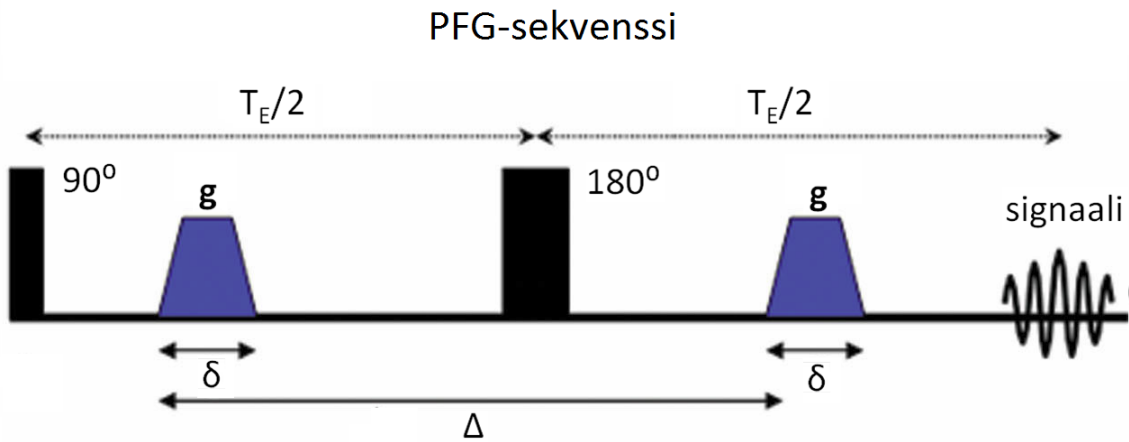
3.3 Diffuusiopainotettu magneettikuvaus

3.3.1 Diffuusio kontrastin lähteenä

Kuten kappaleessa 2.2.1 todettiin, voidaan näytteen sisäisten ominaisuuksien, kuten protonitiheyden tai pitkittäisen ja poikittaisen relaksaatioajan, vaikutusta magneettikuvan kontrastiin painottaa säätelämällä ulkoisia parametreja, kuten kallistuskulmaa tai kaiku- ja toistoaikaa. Myös diffuusiovakiota D voidaan pitää magneettikuvan kontrastiin vaikuttavana sisäisenä ominaisuutena ja on mahdollista määrittää

diffuusiokontrastia painottava ulkoinen parametri, joka riippuu diffuusiogradienttien voimakkuudesta ja ajoituksesta. Vaikka protoneja on kehossa monissa eri molekyyliissä, voidaan olettaa, että diffuusiopainotettuun MRI-signaaliin vaikuttavat lähinnä vesimolekyylien mukana diffundoituvat protonit. (Mori & Zhang 2006)

Yleisin tapa saada MRI-signaali riippumaan diffuusiosta on alunperin Stejskalin ja Tannerin (1965) kehittämä niin sanottu PFG-sekvenssi (*pulsed field gradient*). Se koostuu kahdesta samansuuntaisesta ja yhtä voimakkaasta diffuusiogradientista, joiden kesto on δ , sekä niiden välissä olevasta 180° :n refokusointipulssista (kuva 3.3). Diffuusiogradienttien välinen aika on Δ ja niiden voimakkuutta ja suuntaa kuvataan vektorilla \mathbf{g} . (Shemesh et al. 2010; Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 210)



Kuva 3.3: Kaaviokuva PFG-sekvenssistä (muokattu lähteestä Shemesh et al. 2010). Diffuusiogradienttien \mathbf{g} kestoja kuvataan parametrilla δ ja niiden välinen aika on Δ .

PFG-sekvenssin toiminta perustuu samaan ilmiöön kuin signaalin paikantaminen kuvanmuodostusta varten: kun magneettikenttään luodaan tietynsuuntainen gradientti, spinien prekessiotajuudet muuttuvat paikan funktiona. PFG-sekvenssissä ensimmäinen diffuusiogradientti antaa spineille tietyn vaihesiirron niiden sijainnin mukaan, jonka jälkeen refokusointipulssi kääntää vaihedispersion suunnan, kuten spin-kaikussekvenssissä. Jos vesimolekyylit ovat pysyneet paikoillaan, jälkimmäinen diffuusiogradientti kumoaa ensimmäisen aiheuttaman vaihesiirron ja spinit ovat jälleen samassa vaiheessa. Jos molekyylit sen sijaan ovat liikkuneet diffuusiogradienttien välisenä aikana diffuusiogradienttien suunnassa, vaihesiirto ei kumoudu täysin ja spineillä on jokin tietty nettovaihe. Tämä pienentää xy-tason magnetisaation voimakkuutta ja siten heikentää signaalia. (Mori & Zhang 2006)

Diffuusion vaikutus MRI-signaaliin voidaan määrittää kvantitatiivisesti lisäämällä signaalin voimakkuutta kuvaavaan yhtälöön diffuusion aiheuttama vaimenemistermi e^{-bD} :

$$S(b) = \rho_P(1 - e^{-T_R/T_1})e^{-T_E/T_2}e^{-bD} = Ce^{-bD}, \quad (3.11)$$

jossa ρ_P on protonitiheys, b on diffuusion vaimenemisparametri (niin sanottu b-arvo) ja D näennäinen diffuusiovakio. Jos poikkeutuskulma, toistoaika ja kaiku aika pidetään vakiona, voidaan kolme ensimmäistä termiä yhdistää vakioksi C . (Mori & Zhang 2006; Wheeler-Kingshott et al. 2003, 208)

3.3.2 Erilaiset diffuusiopainotukset ja b-arvo

Yhtälön (3.11) mukaan diffuusiopainotetun MRI-signaalin voimakkuuteen vaikuttavat sekä näytteen diffuusio-ominaisuudet että pulssisekvenssin parametreista riippuva b-arvo. Yleinen muoto b-arvolle saadaan yhtälöstä

$$b = \int_0^t \mathbf{k}^2 dt', \quad \mathbf{k} = \gamma \int_0^t \mathbf{g} dt', \quad (3.12)$$

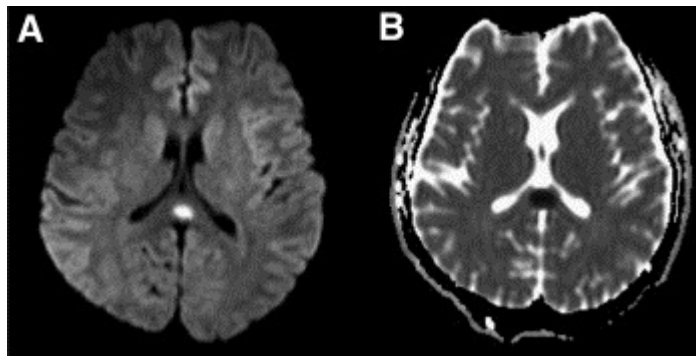
jossa \mathbf{k} on gradientin \mathbf{g} ensimmäinen momentti ja γ on gyromagneettinen vakio. (Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 209) PFG-sekvenssissä b-arvo voidaan lausua diffuusiogradienttien voimakkuuden g , keston δ sekä niiden välisen ajan Δ mukaan seuraavasti:

$$b = \gamma^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{1}{3} \delta \right) g^2, \quad (3.13)$$

Siten diffuusio-ominaisuudet voidaan määrittää gradientin \mathbf{g} suunnassa ja b-arvolla säädellään diffuusiopainotuksen voimakkuutta. (Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 210) Yhtälöstä (3.13) nähdään, että b-arvon SI-yksikkö on s/m^2 , mutta yleensä b-arvot ilmoitetaan muodossa s/mm^2 . Tyypillinen b-arvo aivoja kuvattaessa on luokkaa $b = 1000 \text{ s/mm}^2$ (Hiltunen et al. 2007).

Diffuusiopainotettu sekvenssi voidaan toistaa esimerkiksi x-, y- ja z- akselien suunnassa ja niistä saatuja diffuusiokarttoja voidaan tarkastella erikseen tai niistä voidaan koostaa diffuusion keskimääräistä voimakkuutta pääakseleiden suunnissa kuvaava kuva. Tässä niin sanotussa DW-kuvassa (*diffusion weighted*) kontrasti perustuu suoraan signaalin voimakkuuteen, joten voimakkaan diffuusion alueet näkyvät tummina ja heikon diffuusion alueet vaaleina (kuva 3.4 A). Näin muodostetussa diffuusiopainotuksessa on kuitenkin aina mukana myös T_2 -painotusta, sillä diffuusiota tarkastelu tehdään kaikuajan puitteissa, jolloin myös poikittainen relaksaatio vaikuttaa signaalin voimakkuuteen. Tämä vaikeuttaa kuvan tulkintaa, sillä vaalea alue saattaa johtua heikon diffuusion lisäksi kudoksen korkeasta T_2 -relaksaatioajasta. (Hoa 2009; Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 211)

T_2 -riippuvuudesta päästään eroon mittaamalla D :n arvo ja käyttämällä sitä kontrastiparametrina. Näennäinen diffuusiovakio voidaan mitata suorittamalla PFG-sekvenssi halutussa suunnassa vähintään kahdella eri b-arvolla ja pitämällä T_E vakiona. Tällöin saadaan kuva, jonka jokaisen pikselin arvo vastaa näytteen vokselin näennäisen diffuusiovakion suuruutta kyseisessä suunnassa. Tällaista kuvaa kutsu-



Kuva 3.4: DW- ja ADC-kuvat (Chen et al. 2011). DW-kuvassa (A) signaali on sitä heikempi ja pikselit sitä tummempia, mitä voimakkaampaa diffuusio on. ADC-kartassa (B) pikselin arvo on puolestaan suoraan verrannollinen näennäisen diffuusiovakion arvoon, joten kontrasti on päinvastainen kuin DW-kuvassa.

taan ADC-kartaksi (kuva 3.4 B). Kahdella eri b -arvolla saatujen signaalien suhde on

$$\frac{S(b_2)}{S(b_1)} = \frac{Ce^{-b_2D}}{Ce^{-b_1D}} = e^{(b_1-b_2)D}, \quad (3.14)$$

josta voidaan ratkaista diffuusiovakio

$$D = \frac{1}{b_1 - b_2} \ln \left[\frac{S(b_2)}{S(b_1)} \right]. \quad (3.15)$$

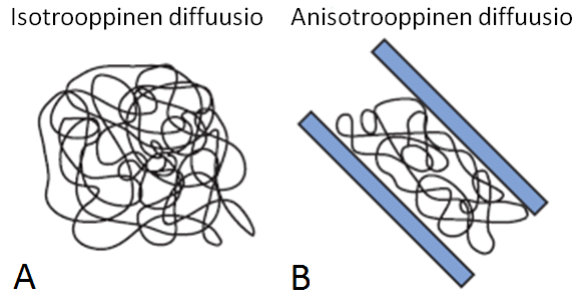
Usein mittaus suoritetaan siten, että $b_1 = 0$ ja $b_2 > 0$. Tällöin saadaan ADC-kartta, jonka intensiteettiskaala on päinvastainen kuin T_2 -komponentin sisältävässä DW-kuvassa, eli voimakkaan diffuusion alueet näkyvät vaaleina ja heikon diffuusion alueet tummina (kuva 3.4 B). (Hoa 2009; Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 209)

3.4 Diffuusiotesorikuvaus

3.4.1 Kontrastia anisotrooppisesta diffuusiosta

Aivoista eri suunnissa mitatut ADC-kartat eroavat selvästi toisistaan, sillä anisotrooppisissa rakenteissa vesimolekyylit pääsevät diffundoitumaan helpommin esteiden suunnassa kuin niitä vastaan kohtisuorassa (kuva 3.5). Esimerkiksi aivojen valkean aineen hermosäiekimpuissa vesi diffundointuu selvästi voimakkaaimmin hermoratojen suunnassa. Siten selvittämällä näennäisen diffuusiovakion arvoja eri suunnissa saadaan tietoa siitä, mihin suuntaan ja kuinka koherentisti suuntautuneita kudusrakenteita ovat. Tätä varten kehitetty DTI-menetelmä hyödyntää diffuusiovakion tensorimuotoa (kappale 3.2.2) diffuusion anisotropian määrittämisessä. (Mori & Zhang 2006; Hiltunen et al. 2007)

DTI-mittauksessa hyödynnetään tietoa, että yhtälön (3.9) diffuusiotesori \mathbf{D} voi-



Kuva 3.5: Isotrooppinen ja anisotrooppinen diffuusio (muokattu lähteestä Hiltunen et al. 2007). Isotrooppisessa diffuusiosta (A) molekyylin liike on satunnaista kaikkiin suuntiin, mutta anisotrooppisessa diffuusiosta (B) esteet rajoittavat diffuusiota yhdessä tai useammassa suunnassa.

daan varauksettomien molekyylin, kuten veden, tapauksessa määritellä täysin kuu- den alkion avulla, sillä $D_{ij} = D_{ji}$:

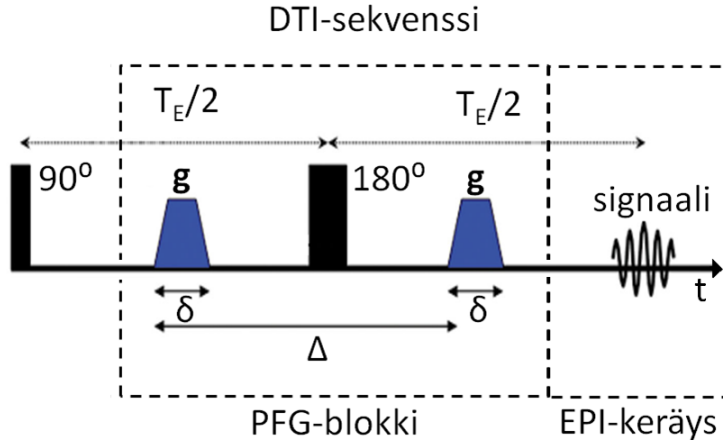
$$\mathbf{D} = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{xy} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{xz} & D_{yz} & D_{zz} \end{pmatrix}. \quad (3.16)$$

Siten DTI-mittauksessa toistetaan kappaleessa 3.3.1 (kuva 3.3) esitelty PFG-sekvenssi vähintään kuudessa eri suunnassa (esimerkiksi x, y, z, xy, xz, ja yz) ja lisäksi niitä ennen otetaan lineaarista regressiota varten yksi kuva ilman diffuusiopainotusta (niin- sanottu b_0 -kuva, $b = 0$). Näin ollen DTI sekvenssissä diffuusiogradientti tuotetaan suunnasta riippuen joko yhdellä gradienttikelalla (x-, y- ja z-suunnat) tai useammalla kelalla yhtä aikaa (esim. xy-, xz- ja yz-suunnat). Yleensä DTI-sekvenssin (kuva 3.6) datankeräys suoritetaan EPI-menetelmällä, jotta kuvausaika saadaan pidettyä kohtuullisena.

Yhtälön (3.16) matriisi \mathbf{D} voidaan diagonalisoida toiseksi matriisiksi \mathbf{D}' , jonka määrittelevät ominaisarvot λ_1 , λ_2 ja λ_3 sekä ominaisvektorit ϵ_1 , ϵ_2 ja ϵ_3 :

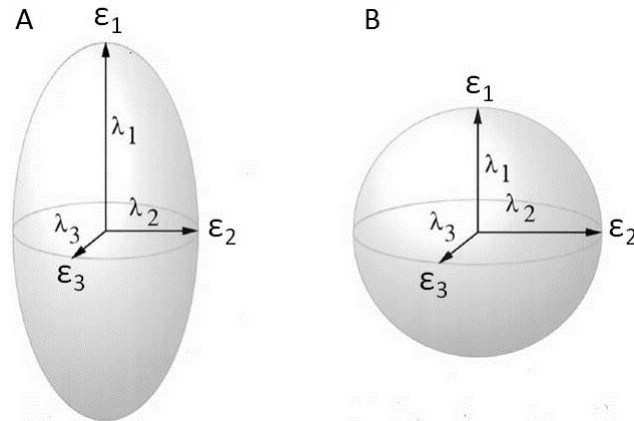
$$\mathbf{D}' = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_3 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \epsilon_1 \\ \epsilon_2 \\ \epsilon_3 \end{pmatrix}. \quad (3.17)$$

Tässä esitysmuodossa ominaisvektorit kuvaavat kohtisuoria suuntia, joiden kesken molekyylin liike ei korreloi, ja ominaisvektoria vastaava ominaisarvo kertoo kyseistä suuntaa vastaavan ADC-arvon. Diffuusiotensori lasketaan jokaiselle vokselille erikseen ja jokaiselle diffuusiotensorille on oma ominaisvektoreiden ja -arvojen yhdistelmä, joka kuvaa näytteen diffuusio-ominaisuuksia vokselin tilavuudessa. Ominaisarvot on tapana järjestää siten, että $\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3$, jolloin ϵ_1 osoittaa diffuusion pääsuunnan. (Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 213-214)



Kuva 3.6: Kaaviokuva DTI-sekvenssistä (muokattu lähteestä Shemesh et al. 2010). Kuvanmuodostusgradientit on kuvan selkeyden takia jätetty piirtämättä ja diffuusio-gradientit (g) on piirretty samalle akselille RF-pulssien ja signaalin kanssa. DTI-kuvauksessa PFG-sekvenssi toistetaan vähintään kuudessa eri suunnassa.

Yhtälön (3.17) ominaisvektorit ja ominaisarvot määrittelevät diffuusioellipsoidin (kuva 3.7), jonka eksentrisyydestä voidaan päätellä kuinka anisotrooppista diffuusio on. Jos kudoksen koostuu sylinterimäisistä, koherentisti suuntautuneista rakenteista, kuten valkean aineen aksonit, ellipsoidi on vahvasti eksentrisen ($\lambda_1 \gg \lambda_2 \approx \lambda_3$). Täysin isotrooppisessa aineessa ellipsoidi on pallo ($\lambda_1 = \lambda_2 = \lambda_3$).



Kuva 3.7: Diffuusiotesorin ominaisarvot ja -vektorit määrittelevät diffuusioellipsoidin (muokattu lähteestä Chepuri et al. 2002). (A) Anisotrooppisessa diffuusiiossa ominaisvektori ϵ_1 osoittaa voimakkaimman diffuusion suunnan. (B) Isotrooppisessa diffuusiiossa ellipsoidi on pallo.

Diffuusioellipsoidista voidaan laskea myös skalaarisuureita, joiden avulla voidaan muodostaa diffuusion anisotropian mukaan painotettuja magneettikuvia. Eräs käy-

tetyimmistä suureista on osittainen anisotropia (FA, *fractional anisotropy*):

$$FA = \frac{\sqrt{(\lambda_1 - \langle D \rangle)^2 + (\lambda_2 - \langle D \rangle)^2 + (\lambda_3 - \langle D \rangle)^2}}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}, \quad (3.18)$$

jossa $\langle D \rangle$ tarkoittaa keskimääräistä diffusiivisuutta eli yhtälön (3.17) ominaisarvojen keskiarvoa. Siten FA-arvo on diffuusioanisotropian voimakkuudesta kertova suhdeluku, ja voimakkaasti sylinterimäiselle anisotropialle $FA \approx 1$ ja täysin isotrooppiselle diffuusiolla $FA = 0$. (Wheeler-Kingshott et al. 2003, s. 217) FA-kartta voi olla harmaasävyinen, mutta monesti se esitetään myös väriskaalattuna.

Koska pelkkä FA-kartta kertoo pelkästään sen, kuinka voimakasta rakenteiden järjestyneisyys on, muodostetaan usein vielä toinen, niin sanottu suuntakoodattu värikartta (DEC, *direction encoded colormap*), jossa voimakkaimman diffuusion suunnat on värikoodattu niiden orientaation mukaan.

3.4.2 DTI:n sovelluskohteet

DTI-menetelmällä saadaan tavalliseen DW-kuvaan verrattuna selvitettyä diffuusion voimakkuuden lisäksi myös sen anisotropian voimakkuus sekä suunta, johon diffuusio on voimakkainta. Tämä tekee siitä hyvän työkalun keskushermoston hienorakenteen selvittämiseen. Sillä saadaan erittäin hyvä kontrasti aivojen valkean ja harmaan aineen välille, sillä valkeassa aineessa hermosolujen aksonit ovat vahvasti hermoratojen suuntaisesti orientoituneita, kun taas harmaassa aineessa orientaatio on huomattavasti satunnaisempaa. Tämän takia DTI:tä käytetään paljon niin sanottuun traktografiaan, eli aivojen hermoratakartoitukseen. (Hiltunen et al. 2007) Kuvaamalla aivot leike kerrallaan DTI-menetelmällä, voidaan muodostaa kolmiulotteisia malleja aivojen hermoratarakenteesta (esimerkiksi Basser et al. 2000). Aikaisemmin vastaavat kartoitukset ovat olleet mahdollisia vain invasiivisilla menetelmillä, kuten kuoleman jälkeen tehtävillä histologiatutkimuksilla.

Toinen merkittävä DTI:n sovelluskohde on erilaisten sairauksien ja aivovammojen aiheuttamat muutokset kudusrakenteiden orientaatioissa ja siten diffuusion anisotropiassa. Esimerkiksi epilepsian, multippeliskleroosin ja Alzheimerin taudin on havaittu aiheuttavan muutoksia FA-arvoissa tietyillä aivojen valkean aineen alueilla (Laitinen et al. 2010; Horsefield & Jones 2002). DTI-tutkimuksilla voi olla tulevaisuudessa merkittävä rooli monien keskushermoston sairauksien havaitsemisessa jo niiden aikaisessa kehitysvaiheessa. Lisäksi DTI:llä on tutkittu jonkin verran myös munuaisia, lihaksia ja ääreishermostoa (Ries et al. 2001; Shinha et al. 2006; Skorpil et al. 2004).

3.4.3 DTI:n puutteet

Özarslanin (2009) mukaan diffuusioanisotropia biologisessa kudoksessa voidaan jakaa kolmeen eri tyyppiin. Ensinnäkin anisotropiaa aiheuttaa mikroskooppisella tasolla siitä, että kudoksessa ylipäänsä on diffuusiota rajoittavia seinämiä, vaikka kudoksen makroskooppisella tasolla olisi isotrooppinen. Tätä anisotropiaa kutsutaan mikroskooppiseksi anisotropiaksi (μA , *microscopic anisotropy*, kuva 3.8 A). Toinen anisotropian lähde on yksittäisten mikrorakenteiden muodosta aiheutuva anisotropia (CSA, *compartment shape anisotropy*, kuva 3.8 B). Näiden lisäksi diffuusioanisotropiaa voi aiheuttaa vielä mikrorakenteiden koherentti suuntautuminen (EA, *ensemble anisotropy*, kuva 3.8 C).

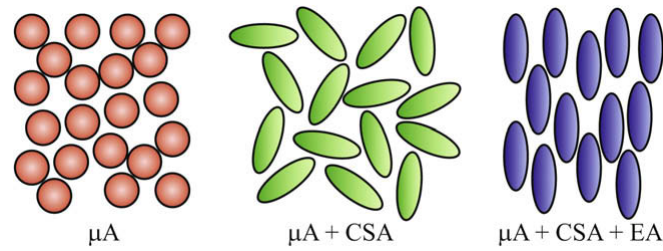
Yhteen gradienttipariin perustuvat diffuusiokuvantamismenetelmät, kuten DTI, ovat hyviä havaitsemaan erityisesti rakenteiden koherentista suuntautumisesta aiheutuvan anisotropian (EA), johon perustuu sen hyvä kyky erottaa aivojen valkea aine muusta kudoksesta. DTI:n rajoitukset tulevat ilmi kuitenkin silloin, kun rakenteet ovat satunnaisesti orientoituneita ja niiden kokojakauma ei ole tasainen, kuten aivojen harmaassa aineessa (kuva 3.9 A-C). Harmaassa aineessa rakenteiden satunnaisuus aiheuttaa sen, että vaikka rakenteet ovat mikroskooppisella tasolla anisotrooppisia, MRI-pikselin makroskooppisella tasolla kontrasti keskiarvottuu isotrooppiseksi. Tämä DTI:n rajoitus luo tarpeen uudentlaisille kontrastiparametreille, joiden avulla voitaisiin tutkia rakenteiden eksentrisyyttä ja suuntautumisen satunnaisuuden tasoa myös aivojen harmaan aineen alueilla.

3.5 Diffuusiokuvaus kahdella gradienttiparilla

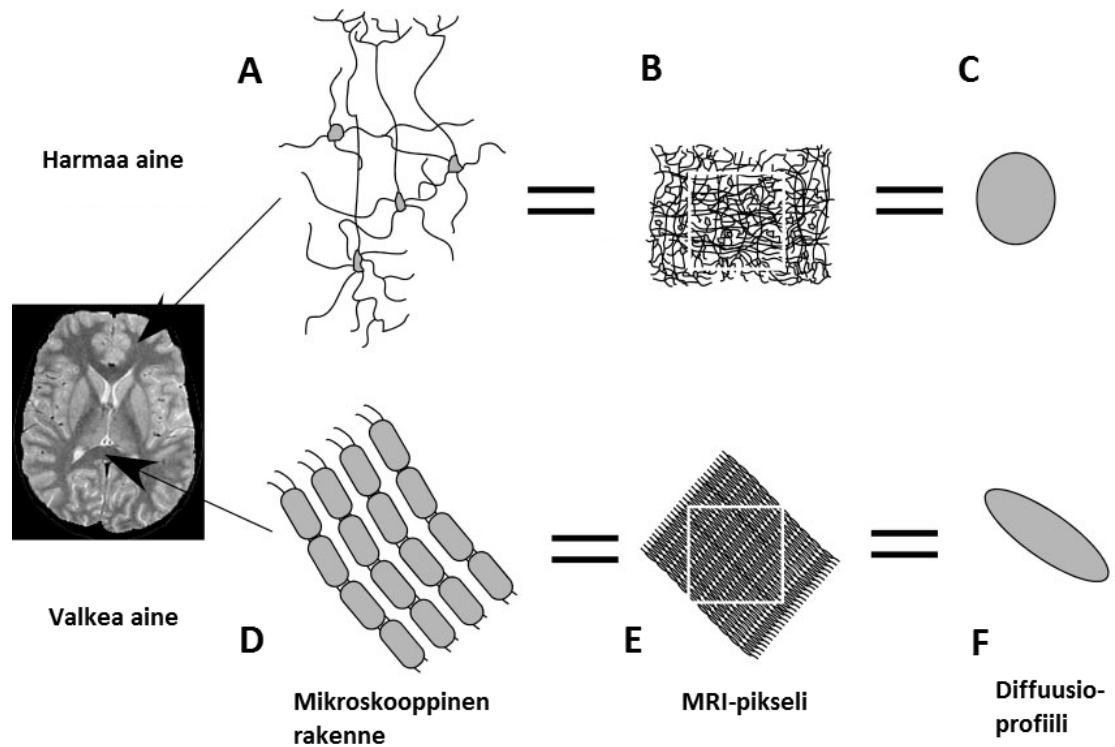
3.5.1 Pulssisekvenssin rakenne

Edellä mainituista DTI-menetelmän puutteista johtuen Stejskalin ja Tannerin (1965) PFG-sekvenssistä on kehitetty kahteen diffuusiogradienttipariin perustuva laajennus (d-PFG, *double pulsed field gradient*), jonka esittelivät ensimmäisinä Cory et al. (1990). Se koostuu kahdesta peräkkäisestä PFG-blokista, joita kuvaavat ajoitus- ja gradienttiparametrit δ_1, Δ_1 ja \mathbf{g}_1 sekä δ_2, Δ_2 ja \mathbf{g}_2 , vastaavasti (kuva 3.10). PFG-blokkien väliin jäävää aikaa kutsutaan sekoittumisajaksi t_m . (Shemesh et al. 2010) Ensimmäisen PFG-blokin jälkeen syntyvää kaikusignaalia ei lueta ja jälkimmäinen signaali luetaan yleensä EPI-menetelmällä. Kokonaiskaikuaika T_{E_tot} jakautuu kahden kaikusignaalin johdosta kahteen osaan T_{E1} ja T_{E2} , jotka ovat symmetrisen d-PFG-sekvenssin tapauksessa yhtä pitkät. Lisäksi kummankin kaikuaajan puolikkaiden tulee olla keskenään yhtä pitkät, kuten spin-kaikusekvenssissä yleensäkin.

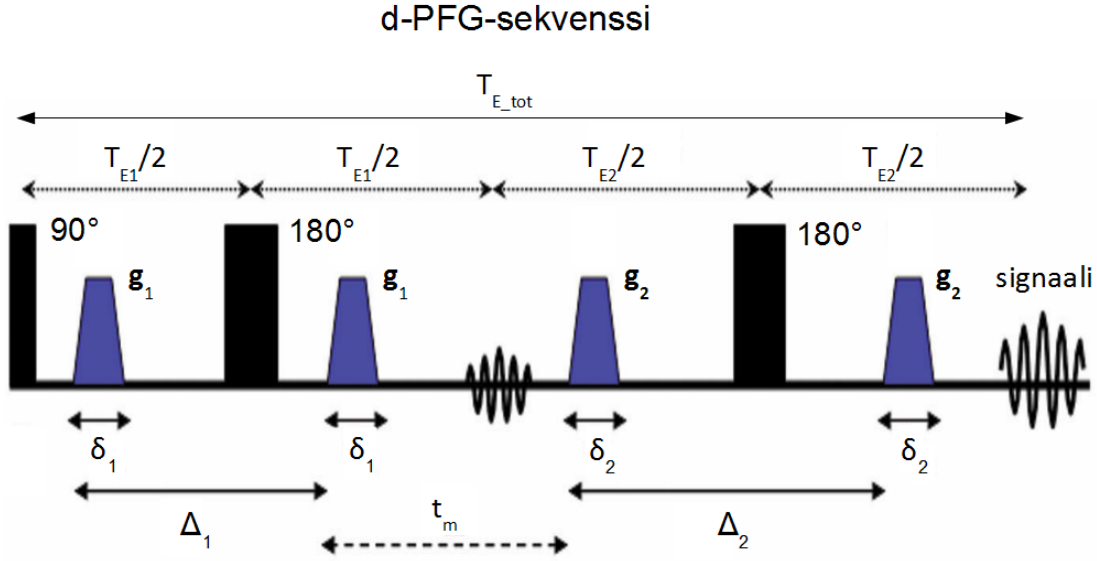
Usein signaalin heikkenemistä d-PFG-sekvenssissä kuvataan kappaleessa 3.3.2 esitellyn b -arvon sijasta aaltovektorin $\mathbf{q} = (2\pi)^{-1}\gamma\delta\mathbf{g}$ avulla, jolloin normalisoitu dif-



Kuva 3.8: Biologisen kudoksen anisotropiat (Özarslan 2009). μA = mikroskooppinen anisotropia, CSA = rakenteen muodosta aiheutuva anisotropia ja EA = rakenteiden suuntautuneisuudesta aiheutuva anisotropia.



Kuva 3.9: Harmaan ja valkean aineen erot (muokattu lähteestä Komlosh et al. 2008). Valkea aine (d) on rakenteeltaan koherentisti orientoitunutta, jolloin MRI-pikselin sisällä (e) havaitaan suuntautumisesta aiheutuva anisotropiaa, ja DTI:n diffuusioprofiili on ellipsoidi. Sen sijaan harmaan aineen satunnaiset orientaatiot (a) saavat MRI-pikselin näyttämään makroskooppisesti isotrooppiselta, vaikka mikroskooppisella tasolla se on anisotrooppinen (b), jolloin DTI:n diffuusioprofiili on pallomainen (c).



Kuva 3.10: Kaaviokuva d-PFG-sekvenssistä (muokattu lähteestä Shemesh et al. 2010). Kuvanmuodostusgradientit on kuvan selkeyden takia jätetty piirtämättä ja diffuusiogradientit (g) on piirretty samalle akselille RF-pulssien ja signaalin kanssa.

fuusiosta aiheutuva MRI-signaalin heikkeneminen voidaan esittää muodossa

$$E(\mathbf{q}) = \frac{S(\mathbf{q})}{S(\mathbf{q}=0)} = e^{-4\pi^2|\mathbf{q}|^2(\Delta-\delta/3)D} = e^{-bD}. \quad (3.19)$$

Näin ollen yhteys b -arvon ja \mathbf{q} välillä on

$$b = 4\pi^2|\mathbf{q}|^2(\Delta - \delta/3) \Leftrightarrow |\mathbf{q}| = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{b}{(\Delta - \delta/3)}}. \quad (3.20)$$

Aaltovektori \mathbf{q} :n yksikkö on m^{-1} , mutta d-PFG-tutkimuksissa se annetaan yleensä muodossa cm^{-1} , jolloin saadaan b -arvon kanssa samaa suuruusluokkaa oleva arvo, kun b -arvo ilmoitetaan yksiköissä s/mm^2 . q -arvo kuvaa yhden PFG-blokin diffuusio-painotusta, joten jos d-PFG-sekvenssi on symmetrinen, koko sekvenssin diffuusio-painotus saadaan laskemalla $2q$ -arvo. (Shemesh et al. 2010)

d-PFG-sekvenssillä on mahdollista tehdä monia erityyppisiä kokeita, sillä se sisältää useita eri muuttujia, kuten gradienttiparien suunnat ja voimakkuudet, diffuusio-periodien pituudet, sekoittumisaika sekä gradienttiparien välinen kulma Ψ . Tyypillisiä variaatioita ovat mittaus, jossa gradienttiparit ovat samansuuntaiset, $\Delta_1 = \Delta_2$ ja q -arvoa kasvatetaan tai mittaus, jossa kaikki muut parametrit ovat vakioita, mutta kulmaa Ψ muutetaan esimerkiksi xy -tasossa. (Shemesh et al. 2010)

3.5.2 Kulmariippuva d-PFG-signaali

Tässä diplomityössä käytettiin edellä mainittua d-PFG-sekvenssin variaatiota, jossa gradienttiparien välistä kulmaa Ψ muutetaan. Tällöin toisen PFG-blokin jälkeen luettava kaikusignaali sisältää diffuusion aiheuttamaa signaalin vaimenemista kahdessa eri suunnassa. Ensimmäisen kerran d-PFG-signaalia rajoitetussa diffuusiassa tutki teoreettisesti Mitra (1995) tarkastelemalla signaalin Taylor-sarjaa. Mitra huomasi signaalin muuttuvan kulman Ψ funktiona, kun tehdään seuraavat oletukset:

- $D\Delta \gg a^2$, jossa a on rakenteen karakteristinen dimensio, kuten halkaisija tai pisin akseli
- $D\delta \ll a^2$
- $\gamma\delta ga = 2\pi qa \ll 1$, joka aiheutuu signaalin tarkastelusta Taylor-sarjana
- (i) $Dt_m \gg a^2$ tai (ii) $Dt_m \ll a^2$ (Mitra 1995).

Mitran teoria ennusti, että kulmariippuva signaali $E(\Psi)$ voisi havaita diffuusiota rajoittavien rakenteiden reunoista aiheutuvan mikroskooppisen anisotropian (μA) myös satunnaisesti orientoituneissa rakenteissa. Tapauksessa (i) (pitkä t_m) signaalin kulmariippuvuus pätee Mitran mukaan vain ellipsoidimaisille muodoille ja ilmenee Taylor-sarjan neljännen asteen termissä. Näin ollen kulmariippuvan d-PFG:n avulla voitaisiin erotella rakenteen muodosta aiheutuva anisotropia (CSA) myös satunnaisesti orientoituneiden rakenteiden tapauksessa. Mitran merkittävin havainto oli kuitenkin tapaus (ii) ($t_m \rightarrow 0$), jolle hän havaitsi signaalin kulmariippuvuuden jo Taylor-sarjan toisen asteen termissä:

$$E = 1 - \frac{(2\pi q)^2}{3} \langle r^2 \rangle (2 + \cos(2\Psi)) + O[(2\pi qa)^4], \quad (3.21)$$

jossa $\langle r^2 \rangle$ on rakenteen gyraatiosäteeseen verrannollinen suure. Tapauksessa (ii) signaalin kulmariippuvuus pätee kaikille, myös pallomaisille muodoille, ja kulmariippuvuuden ilmeneminen jo toisen asteen termissä mahdollistaa rajoitetun diffuusion havaitsemisen jo verrattain alhaisilla gradienttien voimakkuuksilla (Mitra 1995).

Cheng ja Cory (1999) tutkivat pitkän t_m :n tapausta ja näyttivät, että näytteelle, joka koostuu satunnaisesti orientoituneista ellipsoideista, signaalin Taylor-sarjan toisen asteen termi on sama, kun gradientit ovat joko samansuuntaiset tai kohtisuorat. Lisäksi he näyttivät kohtisuorien gradienttiparien tapauksessa signaalien erotuksen noudattavan yhtälöä

$$\Delta E = E(\Psi = 0^\circ) - E(\Psi = 90^\circ) = \frac{2(2\pi q)^4}{375} (b^2 - c^2) + O[(2\pi qa)^6], \quad (3.22)$$

jossa a on ellipsoidin pisimmän akselin pituus ja b ja c lyhyempien akseleiden pituudet.

Edellä mainittujen tarkastelujen ongelma on se, että niissä tehdyt oletukset vaikeuttavat teorian soveltamista käytäntöön ja lisäksi ne sitovat kokeelliset parametrit kudusrakenteiden geometriisiin suureisiin, vaikka juuri niitä haluttaisiin määrittää mittaustuloksista (Shemesh et al. 2010). Tähän ongelmaan saatiin ratkaisu, kun Özarslan ja Bassar (2008) johtivat yleisen muodon d-PFG-signaalin vaimenemiselle yleistämällä yhtälön (3.21) mille tahansa aikaparametrien ja kulman Ψ arvoille. Näin ollen ainoa jäljelle jäävä oletus oli vaatimus matalasta q -arvosta, josta päästiin eroon kun Shemesh et al. (2009) sovittivat useilla pienillä q -arvoilla kerättyä d-PFG-dataa yhtälöön

$$E(q, \Psi) \approx 1 - u^2(\Psi)q^2 + C(\Psi)q^4. \quad (3.23)$$

3.5.3 Aikaisempia d-PFG-kokeita

Ensimmäisessä d-PFG-tutkimuksessa (Cory et al. 1990) tutkittiin signaalin vaimenemista samansuuntaisilla ja kohtisuorilla gradienttipareilla satunnaisesti orientoituneita eksentrisiä hiivasoluja sisältävässä näytteessä. Yhdellä gradienttiparilla tehdyissä mittauksissa vaimenemisprofiilit olivat samanlaiset, mutta d-PFG:n kohtisuorien suuntien vaimenemisprofiilit erosivat toisistaan. Näin ollen voitiin osoittaa, että näyte on mikroskooppisella tasolla anisotrooppinen, vaikka yhdellä diffuusiogradienttiparilla tehty mittaus väittäisi diffuusion olevan isotrooppista.

Callaghan ja Komlosh (2002) käyttivät samaa lähestymistapaa tutkiessaan lyotrooppisia nestekiteitä, joita voidaan approksimoida mikroskooppisina satunnaisesti orientoituneina sylinterimäisinä rakenteina. Komlosh et al. puolestaan tutkivat kyseisellä menetelmällä ensimmäisenä harmaasta aineesta koostuvaa fantomia (2007) sekä myöhemmin sian selkäydintä (2008). Kaikissa edellä mainituissa tutkimuksissa d-PFG menetelmä tarjosi informaatiota mikrotason rakenteista, vaikka yhdellä gradienttiparilla tehdyistä mittauksista saatiin isotrooppinen vaimenemisprofiili.

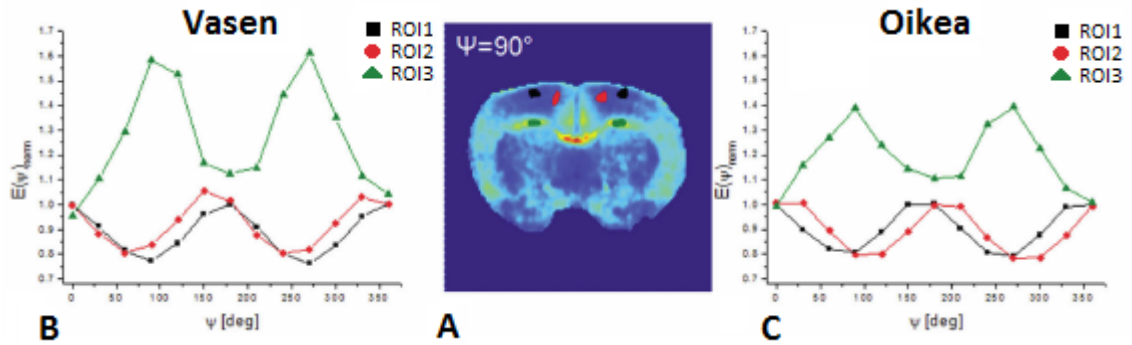
Ensimmäiset *in vivo* -kokeet d-PFG:llä on tehty vasta aivan viime aikoina (Shemesh et al. 2012). Tutkimuksessa kuvattiin aikuisia Wistar-urosrottia kulmariippuvalla d-PFG:llä käyttämällä 13 eri kulman Ψ arvoa ($\Psi = 0^\circ, 30^\circ, 60^\circ, \dots, 360^\circ$), minkä lisäksi suoritettiin myös *ex vivo* -vertailumittauksia perfusoiduilla rotan aivoilla käyttäen samaa sekvenssiä. Shemesh et al. (2012) analysoivat d-PFG-dataa normalisoimalla jokaista kulman arvoa vastaavan kuvan ensimmäisen ja viimeisen (0° ja 360°) kuvan keskiarvolla. Normalisoidusta datasta huomattiin, että ensimmäistä ja viimeistä kulman arvoa vastaavat kuvat vastasivat odotetusti toisiaan, ja lisäksi 180° :n kulmalla saatu kuva oli hyvin lähellä niitä. Suurimmat erot intensi-

teetissä 0° :n ja 360° :n suuntiin nähden saatiin kulmilla $\Psi = 90^\circ$ ja $\Psi = 270^\circ$.

Normalisoinnin jälkeen Shemesh et al. (2012) sovittivat datan pikseli kerrallaan fenomenologiseen yhtälöön

$$E_{norm}(\Psi) = 1 - aE \cdot [\sin^2(\Psi + \varphi)] + C, \quad (3.24)$$

jossa aE eli näennäinen eksentrisyys (*apparent eccentricity*), φ eli residuaalivaihe (*residual phase*) ja vakio C ovat sovitettavia parametreja. Tutkimuksessa piirrettiin normalisoituja intensiteettikäyriä kulman funktiona kolmesta eri alueesta (ROI, *region of interest*) aivoissa (kuva 3.11 A) ja havaittiin, että niiden muoto eri alueiden välillä vaihtelee selvästi (kuvat 3.11 A ja C). Esimerkiksi ROI 3 -alueella intensiteetillä on maksimit kulmilla $\Psi = 90^\circ$ ja $\Psi = 270^\circ$ kun taas ROI 1 -alueella on vastaavissa kohdissa intensiteetin minimi. Lisäksi alueella ROI 2 havaitaan vaihesiirto verrattuna pisteen $\Psi = 180^\circ$ suhteen symmetriseen ROI 1 -käyrään ja vaihesiirron havaitaan olevan eri aivopuoliskojen alueella päinvastaisiin suuntiin.

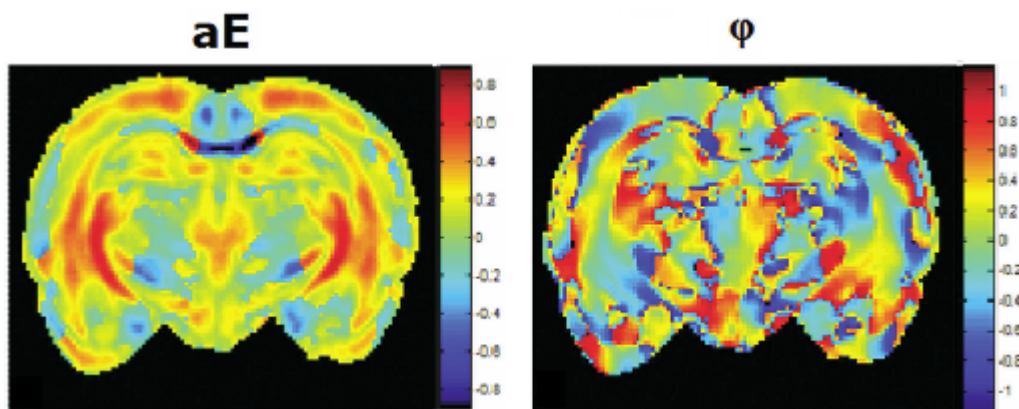


Kuva 3.11: Kulmariippuvan d-PFG:n normalisoitujen intensiteettiarvojen muutos kulman funktiona vasemmassa (b) ja oikeassa (c) aivopuoliskossa kolmella eri ROI-alueella (a) (muokattu lähteestä Shemesh et al. 2012).

Yhtälöstä (3.24) voidaan huomata, että aE -arvo vaikuttaa intensiteettikäyrän amplitudiin sekä siihen, onko käyrän suurin intensiteettipoikkeama positiivinen vai negatiivinen vertailuarvoon nähden. Lisäksi Shemesh et al. (2012) osoittivat simulaatioiden avulla, että residuaalivaihe φ on verrannollinen kudusrakenteiden residuaaliseen orientaatioon, eli siihen, kuinka suuri osuus kudusrakenteista on koherensisti suuntautuneita. Mitä enemmän koherenttia orientaatiota kudoksessa on, sitä suurempi residuaalivaihe φ :n arvo on.

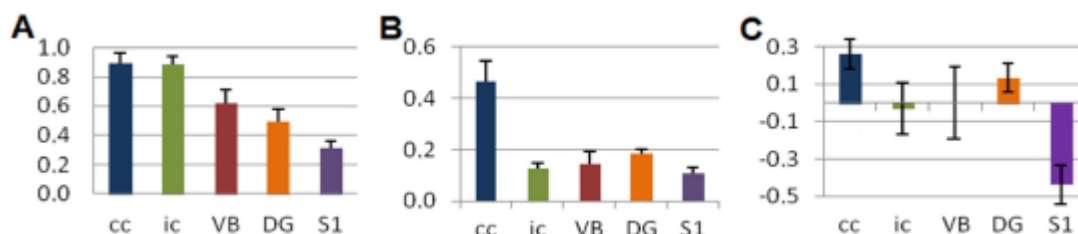
Lisäksi Shemesh et al. (2012) muodostivat sovitusparametrien avulla värikarttoja esimerkiksi aE - ja φ -arvoista (kuva 3.12), joita analysoitiin ja verrattiin muun muassa DTI:llä saatuihin FA- ja DEC-karttoihin. d-PFG-värikartoissa todettiin olevan kontrastia myös harmaassa aineessa, kuten aivokuoren eri kerroksissa, mitä ei DTI-kartoissa havaittu. Lisäksi aE -arvojen todettiin olevan eri merkkisiä esimerkiksi

aivokuoren ja talamuksen reunaosien harmaan aineen alueiden välillä ja φ -arvojen todettiin olevan eri aivopuoliskojen alueella vastakkaismerkkisiä, kuten havaittiin myös edellä olevista intensiteettikäyristä.



Kuva 3.12: Intensiteettidataan sovitettujen parametrien aE ja φ avulla muodostetut värikartat rotan aivojen koronaalisesta leikkeestä (Shemesh et al. 2012).

Shemesh et al. eivät vertailleet d-PFG:tä ja DTI:tä kvantitatiivisesti, mutta Miettisen et al. (2012) tekemässä *ex vivo* -tutkimuksessa tehtiin myös kvantitatiivinen vertailu d-PFG:n ja DTI:n välillä vertaillen kahden valkean aineen (cc ja ic) ja kolmen harmaan aineen (VB, DG ja S1) ROI-arvoja (kuva 3.13).



Kuva 3.13: *Ex vivo* -vertailu viidestä eri ROI-alueesta d-PFG:n ja DTI:n välillä (Miettinen et al. 2012) ($A = FA$, $B = |aE|$, $C = \varphi$). cc = aivokurkiainen, ic = sisäkotelo, VB = ventrobasaalinen kompleksi, DG = hippokampuksen pykäläpöimu, S1 = primäärinen somatosensorinen korteksi.

Tutkimuksessa vertailtiin aluieden FA -, $|aE|$ - ja φ -arvoja ja niiden riippuvuutta histologialeikkeissä havaittaviin kudusrakenteisiin. Suurimmat erot FA :n ja $|aE|$:n välillä olivat sisäkotelossa (ic), jossa $|aE|$ -arvo oli paljon FA -arvoa pienempi. Valkean aineen alueiden välillä oli myös havaittava ero histologiakuvissa, joista havaittiin sisäkotelossa olevan enemmän risteäviä rakenteita kuin aivokurkiaisessa. Tämä heijastui myös erona aluieden φ -arvoissa. Harmaan aineen alueille sekä FA - että $|aE|$ -arvot olivat matalia. Harmaassa aineessa histologiakuvista havaitun koherentin suuntautumisen määrä vaihteli alueien välillä ja tämä havaittiin myös muutoksina alueiden φ -arvoissa.

4. PULSSISEKVENSSIN IMPLEMENTOINTI

Ensimmäinen tämän diplomityön tavoitteista oli implementoida kulmariippuva d-PFG-sekvenssi tutkimusryhmän Bruker PharmaScan 7T -magneettikuvauslaitteistolle, jotta sekvenssiä voitaisiin käyttää *in vivo* -kuvantamisessa. Tässä luvussa esitellään implementointi pääpiirteittäin sekä ohjelmakoodin tärkeimmät osat siten, että lukija ja sekvenssin myöhemmät käyttäjät ymmärtävät sen rakenteen ja toiminnan periaatteet. Sekvenssin tarkempi rakenne muuttujineen löytyy kaaviona liitteestä A.

4.1 ParaVision -ohjelmisto ja tiedostorakenne

Bruker PharmaScan 7T -laitteistoa käytetään Linux-pohjaisella ParaVision -ohjelmistolla, josta tällä hetkellä käytössä on versio 5.1. Uusien kuvantamismenetelmien implementointi ParaVisioniin toteutetaan kokonaisuuksina, joita kutsutaan metodeiksi. Menetelmät ovat useista tiedostoista koostuvia ohjelmoitavia kokonaisuuksia, joiden tarkoitus on helpottaa kuvantamismenetelmien käyttämistä. Yksi menetelmien tehtävistä on johtaa niin sanottuja matalan tason parametreja käyttäjän syöttämistä korkeamman tason parametreista. Käyttäjä voi syöttää ParaVisioniin esimerkiksi kaikuajan T_E , joka on korkean tason parametri. Menetelmä määrittää kyseisen T_E :n toteuttamiseen tarvittavat matalan tason parametrit, kuten pulssisekvenssin tapahtumien välillä olevat viiveet, sekä huolehtii, että käyttäjän syöttämät arvot ovat sallituissa rajoissa ja yhteensopivia muiden parametrien kanssa. (Method Programming 2010) Menetelmien käyttämät parametrit voidaan jakaa globaaleihin, ParaVisioniin valmiiksi ohjelmoituihin parametreihin sekä lokaaleihin, käyttäjän itse luomiin parametreihin. Globaalit parametrit tunnistaa PVM-etuliitteestä, esimerkiksi *PVM_EchoTime*.

Metodi koostuu useista tiedostoista, jotka kommunikoivat keskenään. Seuraavassa on esitelty metodiohjelmoinnin kannalta tärkeimmät tiedostot ja niiden tehtävät (Method Programming 2010):

parsDefinition.h Tässä tiedostossa esitellään muun muassa uudet, käyttäjän määrittelemät lokaalit parametrit.

parsRelations.c Korkean tason parametrien relaatiot, esimerkiksi rajat ja alkuarvot, määritellään tässä tiedostossa. Sisältää myös *backbone*-aliohjelman, jo-

ka päivittää pulssisekvenssin oleelliset osat esimerkiksi parametrin arvon muuttamisen jälkeen.

BaseLevelRelations.c Tiedosto, jossa määritellään muun muassa RF-pulsseihin, ajoitukseen ja gradientteihin liittyvät matalan tason parametrit, joita pulssiohjelma käyttää. Tämä tapahtuu *SetBaseLevelParam* -aliohjelmassa, jota *backbone*-aliohjelma kutsuu *parsRelations.c*-tiedostossa.

initMeth.c Tämä tiedosto muun muassa asettaa parametreille alkuarvot, joten uusien parametrien relaatioihin (tiedostossa *parsRelations.c*) tulee viitata täällä.

parsLayout.h Tiedosto, jossa ParaVisionin editorissa näkyväksi tarkoitetut parametrit jaotellaan parametriluokkiin sen mukaan, miten niiden halutaan näkyvän ParaVisionin käyttöliittymässä.

<pulssisekvenssin_nimi>.ppg Tiedosto, joka sisältää varsinaisen pulssiohjelman. Pulssiohjelma koostuu komennoista, jotka viittaavat tiedoston *BaseLevelRelations.c* matalan tason muuttujiin. Pulssiohjelmassa määritellään esimerkiksi pulssisekvenssin tapahtumien järjestys ja kesto sekä silmukkarakenteet.

Lisäksi pulssiohjelman toiminnallisuutta voidaan muuttaa lisäämällä siihen erilaisia moduuleita. Moduulit ovat pulssiohjelman osia, jotka sijaitsevat erillisissä *.mod*-tiedostoissa, joita kutsutaan *.ppg*-tiedostosta. Tämä helpottaa erilaisten pulssisekvenssien rakentamista saman pohjan päälle moduuleja yhdistelemällä.

4.2 Pulssisekvenssin ohjelmointi

Koska d-PFG-sekvenssi saadaan rakennettua DTI-sekvenssistä käytännössä vain lisäämällä siihen toinen diffuusiogradienttipari ja 180°:n radiotaajuuspulssi, päätettiin uuden sekvenssin pohjana käyttää ParaVisionissa valmiina olevaa diffusiokuvantamismoduulia, jota käytetään DTI-kuvantamiseen (tiedosto *DwiHead.mod*). Tätä työtä varten sekvenssistä toteutettiin yksinkertainen versio, jossa molempien diffuusiogradienttiparien parametrit ovat identtiset sillä erotuksella, että ensimmäisen gradienttiparin suunta on kiinteä ja jälkimmäinen voi kääntyä. Sekvenssin datankeräys haluttiin hoitaa EPI-menetelmällä, jota käytetään myös DTI:n kanssa, joten myös d-PFG-pulssiohjelmaan liitettiin EPI-lukumoduuli (tiedosto *epiHead.mod*).

Pulssiohjelman sisältävän *.ppg*-tiedoston tärkeimpiä tehtäviä on listata pulssisekvenssien tapahtumien järjestys jakamalla sekvenssi tietynpituisiin ajanjaksoihin eli viiveisiin (*delay*). Pulssiohjelma koostuu listasta viivekomentoja sekä mahdollisista komennoista suorittaa jokin tehtävä, kuten esimerkiksi viritys- tai gradienttipulssi,

kyseisen viiveen aikana. d-PFG-sekvenssiä varten luotiin oma tiedosto *DpfgEpi.ppg*, jonka pohjana käytettiin EPI-pohjaisen DTI-sekvenssin vastaavaa tiedostoa. *DpfgEpi.ppg*-tiedosto löytyy kokonaisuudessaan liitteestä B. Myös muut metodin tarvitsemat tiedostot luotiin tekemällä tarvittavat muutokset DTI-metodin tiedostoihin.

4.2.1 Uusien parametrien määrittäminen

Sekvenssin toteuttamiseksi oli tarpeen luoda joitakin uusia parametreja, joiden esittely tapahtuu tiedostossa *parsDefinition.h*. Alle on koottu luettelo uusista parametreista sekä lyhyt kuvaus jokaisesta.

DPFG_FixedGradRO, DPFG_FixedGradP, DPFG_FixedGradS

Kolme parametria, joiden avulla voidaan valita, mitä gradienttikanavaa (*readout*, *phase*, *slice selection*) kiinteä diffuusiogradienttipari käyttää. Muuttujat saavat arvon 0 tai 1. Pulssiohjelmassa (Liite B) nämä parametrit kerrotaan parametrilla *PVM_DwGradAmp*, jolloin saadaan prosenttiosuus gradientin maksimivoimakkuudesta.

DPFG_FixedSpoil Kolmea edellistä vastaava parametri, jonka avulla voidaan valita ensimmäisen refokusointipulssin spoiler-gradienttien kanava ja voimakkuus. Voimakkuus on suoraan käyttäjän määritettävissä, joten arvot ovat välillä 0-100.

TE1, ... , TE4 Neljä parametria, joihin lasketaan jokaisen T_E -segmentin pituus ennen niiden tasaamista samanpituiseksi.

TE_FillDelay1, ... , TE_FillDelay4 Neljä viiveparametria, jotka pulssiohjelmaan lisäämällä T_E -segmentit tasataan samanpituiseksi.

NewTE1, ... , NewTE4 Neljä tarkistusparametria, joilla lasketaan T_E -segmenttien pituus tasaamisen jälkeen.

MixingTime Parametri, johon lasketaan sekoittumisajan pituus. Tässä sekvenssin versiossa sekoittumisaika ei ole itsenäinen parametri, vaan se määräytyy muiden ajoitusparametrien mukaan.

Kaikki edellä mainitut parametrit sisällytettiin myös tiedostoon *parsLayout.h* luokkaan *DPFG_pars*, jotta ne näkyvät käyttäjälle ParaVisionin käyttöliittymässä.

4.2.2 Pulssiohjelmätiedosto ja diffuusiomoduuli

Kuten DTI-sekvenssin tapauksessa, myös uusi pulssiohjelmätiedosto *DpfgEpi.ppg* sisältää tiedoston alussa viittaukset siihen liitettäviin diffuusio- ja EPI-moduuleihin

```
#include <DwiHead.mod>
#include <epiHead.mod>.
```

Itse pulssiohjelmassa EPI-keräyksen aloittaa komento `#include <epi.mod>`. (Liite B)

Diffuusiomoduulitiedostossa *DwiHead.mod* esitellään muun muassa kaikki diffuusiomoduuliin liittyvät viive-, pulssi- ja gradienttikomennot sekä muuttujat joihin ne viittaavat. Esimerkiksi rivi `define delay DwD1 = {$PVM_DwD1}` määrittelee viivekomennon `DwD1`, joka viittaa muuttujaan *PVM_DwD1*. Tämän lisäksi moduulitiedosto sisältää erityyppisiä diffuusiosekvenssejä toteuttavia aliohjelmia, joihin viitataan `subr` -komennoina. Varsinaisessa pulssiohjelmassa esiintyy viittaus `subr DwiPrep(ph1)`. Tämä aliohjelma (ohjelma 4.1) suorittaa yksinkertaisesti valinnan, minkä tyyppistä diffuusiosekvenssiä käytetään, sen mukaan mikä arvo muuttujalle *PVM_DiffPrepMode* on annettu.

```
subroutine DwiPrep(phase dwph)
{
    if(PVM_DiffPrepMode == 0)
    {
        subr DwSe(dwph)
    }
    if(PVM_DiffPrepMode == 1)
    {
        subr DwSte(dwph)
    }
    if(PVM_DiffPrepMode == 2)
    {
        subr DwDse(dwph)
    }
}
```

Ohjelma 4.1: *Diffuusiosekvenssityypin valintaan käytettävä aliohjelma tiedostossa DwiHead.mod. Tässä työssä toteutettiin vain yksinkertainen spin-kaikutyyppinen sekvenssi, joten toteutettava aliohjelma on aina DwSe (ohjelma 4.2).*

Tässä työssä toteutetussa yksinkertaisessa spin-kaikutyyppisessä d-PFG-sekvenssissä haluttiin käyttää tavanomaista spin-kaikuun perustuvaa diffuusiosekvenssiä, joten ParaVisionissa muuttujan *PVM_DiffPrepMode* arvoksi annetaan aina 0, jolloin pulssiohjelmassa toteutetaan aliohjelma *DwSe* (ohjelma 4.2). Kyseinen aliohjelma on pulssiohjelman osa, joka listaa diffuusiomoduulin viivekomennot (*DwD0*, ..., *DwD7*) halutussa järjestyksessä, sekä niiden aikana mahdollisesti suoritettavat muut tapahtumat. Ohjelma 4.1 antaa mahdollisuuden toteuttaa diffuusiopainotettu sekvenssi myös *stimulated spin echo* (*DwSte*) tai *double spin echo* (*DwDse*) -

```

subroutine DwSe(phase dwseph)
{
DwD0 groff
  if(PVM_DwDirectScale == Yes)
  {
    DwD5 DwGDS1
  }
  else
  {
    DwD5 DwG1
  }
DwD6 groff
DwD2 DwGSP2
DwD3 grad{(0)|(0)|(PVM_DwSliceGrad,no_scale)} DwF10:f1
gatepulse 1
DwP0:sp23 dwseph
DwD4
DwD2 DwGSP2
DwD7 groff
  if(PVM_DwDirectScale == Yes)
  {
    DwD5 DwGDS1
  }
  else
  {
    DwD5 DwG1
  }
DwD1 groff
}

```

Ohjelma 4.2: *Spinkaikutyyppisen diffuusiiosekvenssin toteuttava aliohjelma*

tyyppisenä spin-kaikusekvenssin muunnoksena, mutta niitä ei sisällytetty tähän toteutukseen.

Ohjelmassa 4.2 varsinaiset diffuusiogradientit toteutetaan viivekomennon DwD5 aikana komennolla DwG1. If-lauseen toisessa haarassa olevaa gradientin direct scale -versiota ei käytetä tässä toteutuksessa, mutta rakenne jätettiin ohjelmaan mahdollista myöhempää tarvetta varten. Komento DwG1 esitellään moduulitiedoston alussa:

```

#define DwG1 \
grad{DwGR1(100,no_scale)|DwGP1(100,no_scale)|DwGS1(100,no_scale)}

```

Sen kolme komentoa DwGR1, DwGP1 ja DwGS1 viittaavat kolmen gradienttikanavan (luku (*readout*), vaihe (*phase*) ja leike (*slice*), vastaavasti) amplitudeihin. Näiden kolmen komennon avulla gradientti voidaan suunnata mihin tahansa kolmiulotteisessa

avaruudessa ja komentoja vastaavat muuttujat on esitelty *DwiHead.mod*-tiedoston alussa:

```
#define DwGR1 PVM_DwGradRead
#define DwGP1 PVM_DwGradPhase
#define DwGS1 PVM_DwGradSlice.
```

Nämä kolme PVM-muuttujaa ovat prosenttiosuuksia kyseisen gradienttikananavan maksimiamplitudista. Diffuusiomoduuli laskee niiden arvot kertomalla kunkin muuttujan arvon halutun gradienttisuunnan suuntaisen yksikkövektorin komponentin arvolla. Komponenttien arvot syötetään taulukkoon ParaVisionin käyttöliittymän kautta. Kun gradientti on suunnattu oikein, täytyy sen voimakkuus vielä skaalata pitäen komponenttien voimakkuudet samana suhteessa toisiinsa, jotta voidaan valita diffuusiiosekvenssille haluttu b-arvo. Tästä tehtävästä vastaa diffuusiomoduulin käyttäjän antamien syötteiden perusteella laskema muuttuja *PVM_DwGradAmp*.

Koska sekvenssin toteutus on spin-kaikutyyppinen, on diffuusiogradienttiparien välissä 180° refokusointipulssi, joka toteutetaan pulssiviiveen *DwP0* aikana. Refokusointipulssin leikkeenvalintagradientti *PVM_DwSliceGrad* on päällä viiveiden *DwD3*, *DwP0* ja *DwD4* ajan. Lisäksi refokusointipulssin molemmin puolin ovat spin-kaikutyyppiselle sekvenssille olennaiset spoiler-gradientit viiveiden *DwD2* aikana. Diffuusiomoduuli laskee myös spoiler-gradienttien suunnan samalla periaatteella kuin itse diffuusiogradienttien tapauksessa.

Kaikista diffuusiomoduulin tarvitsemien muuttujien laskemista vastaa *backbone*-aliohjelmassa sijaitseva funktio *STB_UpdateDiffusionPreparation*. Sen lisäksi että se esimerkiksi päivittää ohjelman 4.2 tarvitsemat viiveet, se laskee niiden avulla muun muassa alarajan diffuusiomoduulin osuudelle kaikuajasta (*prepEchoTime*) sekä päivittää valituilla parametreilla saatavan leikkeen paksuuden (*sliceThick*).

4.2.3 Pulssiohjelmätiedoston muokkaus

Koska d-PFG-sekvenssistä haluttiin tehdä symmetrinen, eli molempien PFG-jaksojen ajoitusparametrit haluttiin identtisiksi, todettiin helpoimmaksi ratkaisuksi diffuusiomoduulin valmiiksi laskemien viiveiden ja muiden parametrien (ohjelma 4.2) käyttäminen sellaisenaan alkuperäisen PFG-jakson edessä. Tällöin vältetään uusien viiveparametrien luomiselta ja niiden laskemiselta, eikä Brukerin alkuperäisen *STB_UpdateDiffusionPreparation*-funktion toimintaan tarvitse puuttua. Lisäys tehtiin käytännössä siten, että *DpfgEpi.ppg*-tiedostossa ohjelman 4.2 sisältö lisättiin sellaisenaan juuri ennen kommentia, jossa ohjelmaa 4.2 kutsutaan (Liite B). Tällöin päädyttiin rakenteeseen, jossa on kaksi ajoitukseltaan identtistä PFG-jaksoa peräkkäin.

Ensimmäisen jakson diffuusiogradienttikomentoihin lisättiin uudet niitä varten luodut parametrit *DPFG_FixedGradRO*, *DPFG_FixedGradP*, *DPFG_FixedGradS*,

joiden avulla voidaan valita diffuusiogradienttien käyttämä kanava:

```
DwD5 grad{(PVM_DwGradAmp[0]*DPFG_FixedGradRO) |
          (PVM_DwGradAmp[0]*DPFG_FixedGradP) |
          (PVM_DwGradAmp[0]*DPFG_FixedGradS)}.
```

Kiinteät diffuusiogradientit laitettiin ensimmäiselle, eli lukukanavalle (*readout*), eli muuttujan *DPFG_FixedGradRO* arvo on yksi ja kaksi muuta muuttujaa ovat nollia. Kanavanvalintamuuttujat kerrotaan diffuusiomoduulin laskemalla skaalaus-tekijällä *PVM_DwGradAmp[0]*, joka skaalaa diffuusiogradienttien voimakkuudet samoiksi kuin kääntyvillä diffuusiogradienteilla. Tämän lisäksi refokusointipulssin molemmiin puolin olevat spoiler-gradientit tuli muuttaa myös kiinteäsuuntaisiksi lisäämällä diffuusiogradienttien kanssa samalle kanavalle spoiler-gradientin voimakkuutta kuvaava parametri *DPFG_FixedSpoil*:

```
DwD2 grad{(DPFG_FixedSpoil) | (0) | (0)}.
```

Näin ollen sekvenssin rakenne oltiin saatu muutettua sellaiseksi, että PFG-jaksojen ajoitusparametrit ovat identtiset, mutta vain jälkimmäisen, eli alkuperäisen gradienttiparin suunta voi muuttua. Lisäksi kääntyvän gradienttiparin suunnat muutettiin vastaamaan kulmariippuvan d-PFG-sekvenssin haluttuja suuntia. Suunnat valittiin siten, että gradienttipari kääntyy luku- ja vaihesuuntien muodostamassa tasossa täyden ympyrän 13:ssa askeleessa, jolloin gradienttiparien välinen kulma $\Psi = 0^\circ, 30^\circ, 60^\circ, \dots, 360^\circ$. Tämä valinta tehtiin, sillä 13:a kulmaa käytettiin myös aikaisemmissa tutkimuksissa (esimerkiksi Shemesh et al. 2012 ja Miettinen et al. 2012), mutta lukumäärä on muutettavissa. Suunnat syötetään ja tallennetaan ParaVisionin käyttöliittymän kautta taulukkoon *PVM_DwDirInput*, jossa jokaiselle suunnalle annetaan luku-, vaihe- ja leikesuuntaa vastaavan yksikkövektorin komponentin suuruus. Koska gradienttipari kääntyy luku- ja vaihesuuntien muodostamassa tasossa, ovat leikesuunnan komponentit nollia. Luku- ja vaihesuuntia vastaavien komponenttien suuruudet ovat kulman Ψ sinejä ja kosineja, vastaavasti. Jälkeenpäin huomattiin, että gradienttien pyörimissuunta on päinvastainen kuin *ex vivo*-sekvenssissä, mikä vaikuttaa residuaalivaiheen etumerkkiin. Tuloksia analysoitaessa kuvaajat piirrettiin kuitenkin siten, että vaihesiirto φ on samaan suuntaan sekä *in vivo*- että *ex vivo*-datassa.

4.2.4 Pulssisekvenssin ajoituksen ohjelmointi

Kun kiinteä diffuusiogradienttipari oli lisätty pulssiohjelmaan, täytyi huolehtia vielä ohjelman kaikuajan päivittämisestä ja siitä, että kaikki kaikuajan neljä osaa (kuva 3.10) ovat yhtä pitkiä. Alkuperäisessä DTI-sekvenssissä tästä huolehtivat *parsRelations.c*-tiedostossa sijaitsevat funktiot *CalcEchoDelay*, *STB_UpdateDiffusionPrepa-*

ration ja *UpdateEchoTime*. Alkuperäisessä sekvenssissä kaiku aika koostuu kolmesta osasta. Ensimmäinen osa on aika virityspulssin puolivälistä diffuusiomodiuulin alkuun, jolle funktio *CalcEchoDelay* laskee minimin (*minte1*). Toinen osa on diffuusiomodiuulin viemä minimiaika kaikuajasta (*prepEchoTime*), joka on oletuksena käyttäjän syöttämä kaiku aika *EchoTime* ja jonka funktio *STB_UpdateDiffusionPreparation* päivittää. Viimeinen osa on aika diffuusiomodiuulin lopusta EPI-modiuulin keskimmäisen kaikusignaalin puoliväliin (*PVM_EpiEchoDelay*). Nämä kolme parametria annetaan funktiolle *STB_UpdateDiffusionPreparation*, joiden avulla, sekä käyttämällä käyttäjän syöttämiä diffuusiogradienttien ajoitusparametreja δ (*PVM_DwGradDur*) ja Δ (*PVM_DwGradSep*), se laskee diffuusiomodiuulin viiveiden pituudet. Tämän jälkeen funktio *UpdateEchoTime* päivittää kaikuajan, mikäli tarvittava kaiku aika on pidempi kuin käyttäjän syöttämä.

Uudessa sekvenssissä ongelmaksi muodostuu se, että edellä mainitut funktiot eivät ole tietoisia alkuperäisen diffuusiomodiuulin eteen lisäystä PFG-jaksosta tai jaksosten välissä olevasta sekoittumisajasta, jolloin kaiku aika ja sen osien pituudet päivittyvät väärin. Ongelma päätettiin ratkaista huomalla jokaiselle kaikuajan neljäsosalle oma viiveparametri ja -komento ja tasaamalla kaikuajan neljäosat pisimmän neljäsosan pituisiksi. Uudet viivekomennot esitellään pulssiohjelmatedoston alussa:

```
define delay FD1 = {$TE_FillDelay1}
define delay FD2 = {$TE_FillDelay2}
define delay FD3 = {$TE_FillDelay3}
define delay FD4 = {$TE_FillDelay4}.
```

Ensimmäinen viivekomento sijoitettiin juuri ennen ensimmäistä PFG-jaksoa, kaksi seuraavaa peräkkäin PFG-jaksosten väliin ja viimeinen toisen PFG-jakson ja EPI-modiuulin väliin (Liitteet A ja B). Näin ollen parametrit *TE_FillDelay2* ja *TE_FillDelay3* muodostavat viiveiden *DwD5* ja *DwD1* kanssa myös d-PDG-sekvenssin sekoittumisajan (parametri *MixingTime*).

Kokonaiskaikuajan osien tasaamista varten täytyy ensin laskea jokaisen neljäsosan pituus ennen tasausta (ohjelma 4.3). Tämä tehdään *backbone*-aliohjelmassa sen jälkeen, kun kaikki pulssiohjelman käyttämät viiveparametrit on laskettu aliohjelmassa *STB_UpdateDiffusionPreparation* ja *SetBaseLevelParam*. Koska ParaVisionissa viiveparametrit määritellään sekunteina ja muut aikaparametrit, kuten pulsien kestot (esimerkiksi virityspulssin kesto *ExcPulse.Length*) millisekunteina, tulee viiveparametrit kertoa tuhannella, kuten ohjelmassa 4.3 on tehty. Ajoitusparametrien kuuluminen kuhunkin kaikuajan osaan käy ilmi graafisesti liitteestä A.

Koska kaikuajan osat ovat käytännössä aina keskenään eri pituisia, jokin niistä on pidempi kuin käyttäjän antaman kaikuajan neljäsosa. Kun neljän osan pituudet ovat tiedossa, lasketaan niistä pisin (*max_TE_segment*), ja päivitetään kaikuajan

pituudeksi (*NewEchoTime*) neljä kertaa pisimmän osan pituus (ohjelma 4.4). Tämän jälkeen lasketaan, paljonko lyhyemmät kaikuajan osat jäävät vajaaksi uuden kaikuajan neljäsosasta ja määrätään saadut arvot kutakin kaikuajan osaa vastaavalle viiveparametrille. Ohjelmassa 4.4 on esitetty kyseinen lasku ensimmäiselle viiveparametrille ja vastaavalla tavalla laskettiin myös kolme muuta parametria.

Lopuksi lasketaan vielä tarkistuksen vuoksi uusien neljäsosien pituudet (*NewTE1*, ... , *NewTE4*) lisäämällä kutakin osaa vastaava viive parametreihin *TE1*, ... , *TE4*. Nyt kaikkien neljän osan tulisi olla yhtä pitkät. Lisäksi lasketaan sekoittumisajan pituus. Sekoittumisajan määritelmänä käytettiin aikaa ensimmäisen gradienttiparin viimeisen gradientin alusta toisen gradienttiparin ensimmäisen gradientin alkuun (kuva 3.10), kuten esimerkiksi Shemeshin et al. 2010 tutkimuksessa. Näin ollen sekoittumisaika lasketaan

```
MixingTime = (PVM_DwD5 + PVM_DwD1 + PVM_DwD0 +
TE_FillDelay2 + TE_FillDelay3)*1000;.
```

Sekoittumisaika määräytyy muiden ajoitusparametrien, kuten $\delta:n$, $\Delta:n$ ja kaikuajan mukaan, sillä sen toteuttaminen itsenäisenä, käyttäjän antamana parametrina todettiin liian monimutkaiseksi. Lisäksi sekvenssin ajoituksen ohjelmoinnissa pidettiin tärkeimpänä kaikuajan päivittämistä oikeaksi, ja esimerkiksi toistoajan päivittymisen läpikäymiseen jäi vähemmän aikaa. Toistoajan ollessa sekuntien suuruusluokkaa, eivät sekvenssin muutoksista aiheutuvat 10 ms:n suuruusluokkaa olevat epätarkkuudet siinä ole kuitenkaan läheskään niin merkittäviä kuin kaikuajassa. Toistoajan laskut on kuitenkin hyvä käydä läpi huolellisemmin, kun sekvenssiä seuraavan kerran kehitetään eteenpäin.

4.3 Metodin kääntäminen ja testaus

ParaVisionin metodit käännetään antamalla hakemistossa `/methods/src/<metodin nimi>` komennot

```
make clean cproto depend
make install.
```

Ensimmäinen komento on tarpeen vain ensimmäisellä kääntämiskerralla ja aina kun metodiin lisätään uusi funktio. Kaikki muut muutokset voidaan kääntää käyttämällä vain jälkimmäistä komentoa. Kääntäjä luo metodista binääritiedoston hakemistoon `/methods/bin`, minkä jälkeen metodi tulee näkyviin kyseiselle käyttäjälle ParaVisioniin. Jos metodi halutaan näkyväksi kaikille käyttäjille, sen binääritiedosto tulee kopioida hakemistoon `<PvInstDir>/prog/parx/pub`, missä `<PvInstDir>` on hakemisto, johon ParaVision on asennettu. (Method Programming 2010, s. 2-4)

```

TE1 = ExcPulse.Length/2 +
      (D[4] + D[2] + D[3] + PVM_DwD0 + PVM_DwD5
       + PVM_DwD6 + PVM_DwD2 + PVM_DwD3)*1000
      + PVM_DwRfcPulse.Length/2;
TE2 = PVM_DwRfcPulse.Length/2 +
      (PVM_DwD4 + PVM_DwD2 + PVM_DwD7 + PVM_DwD5 +
       PVM_DwD1)*1000;
TE3 = (PVM_DwD0 + PVM_DwD5 + PVM_DwD6 + PVM_DwD2 +
       PVM_DwD3)*1000 + PVM_DwRfcPulse.Length/2;
TE4 = PVM_DwRfcPulse.Length/2 +
      (PVM_DwD4 + PVM_DwD2 + PVM_DwD7 + PVM_DwD5 +
       PVM_DwD1)*1000 + PVM_EpiEchoDelay;

```

Ohjelma 4.3: Kaikuajan neljäsosien laskeminen ennen tasausta.

```

double max1, max2, max_TE_segment, NewEchoTime;

max1 = MAX_OF(TE1, TE2);
max2 = MAX_OF(TE3, TE4);
max_TE_segment = MAX_OF(max1, max2);

if(TE1 > EchoTime/4 || TE2 > EchoTime/4 || TE3 > EchoTime/4
   || TE4 > EchoTime/4)
{
    NewEchoTime = 4*max_TE_segment;
}
else
{
    NewEchoTime = EchoTime;
}

if(NewEchoTime/4 - TE1 > 0)
{
    TE_FillDelay1 = (NewEchoTime/4 - TE1)/1000;
}
else
{
    TE_FillDelay1 = 0;
}
:

```

Ohjelma 4.4: Kaikuajan pisimmän neljäsosan laskeminen ja uuden kaikuajan päivitys (yllä). Kaikuajan osat tasaavan viiveparametrin laskeminen muuttujan *TE_FillDelay1* osalta (alla). Vastaavasti laskettiin myös kolme muuta muuttujaa *TE_FillDelay2*, ..., *TE_FillDelay4*.

Kun d-PFG-sekvenssi oli käännetty edellä mainitulla tavalla, sen toimivuus varmistettiin vielä oskilloskoopilla (Tektronix DPO 4054 Digital Phosphor Oscilloscope). Näin voitiin varmistua siitä, että sekvenssi toimii kuten pitää, eikä vahingoita magneettikuvauslaitteistoa. Oskilloskooppi kytkettiin gradienttivahvistimeen ja sekvenssiä ajettiin ParaVisionin kautta jatkuvalla toistolla, jotta oskilloskoopin ruudulta nähtiin jokaisen gradienttikanavan toiminta. Gradienttien todettiin toimivan oikein ja oskilloskoopin ruudulta pystyttiin määrittämään myös sekvenssin aikaparametrien vastaavan ParaVisioniin syötettyjä aikaparametreja, joten sekvenssin todettiin olevan turvallinen käyttää.

5. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

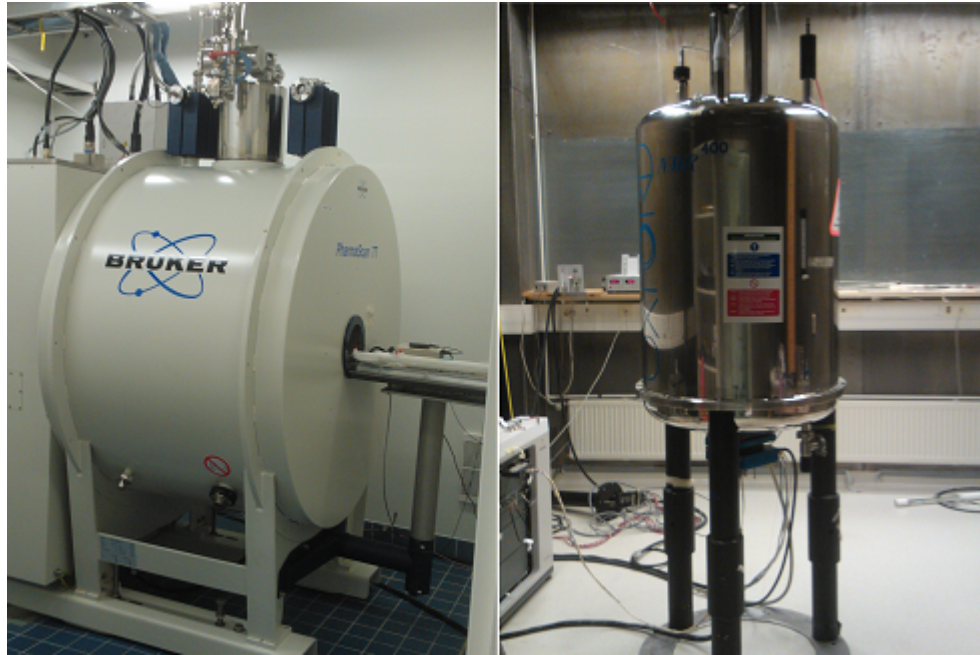
Kun d-PFG-sekvenssi saatiin implementoitua *in vivo* -kuvantamiseen käytettävälle magneettikuvauslaitteistolle, sillä suoritettiin sekä *ex vivo*- että *in vivo* -optimointimittauksia, jotta sekvenssi voitiin todeta toimivaksi ja sen toiminta ja kuvanlaatu saatiin mahdollisimman hyväksi *in vivo* -mittauksia varten. Tämän jälkeen suoritettiin varsinaiset *in vivo* -mittaukset sekä uudella d-PFG-sekvenssillä että DTI-sekvenssillä, jotta niitä voitiin vertailla keskenään. Lisäksi *in vivo* -mittausten tuloksia vertailtiin toisella, *ex vivo* -käytössä olevalla magneettikuvauslaitteistolla tehtyihin d-PFG-mittauksiin. Kyseiselle laitteistolle d-PFG-sekvenssi oli implementoitu jo aikaisemmin ja sen tulokset loivat lähtökohdan tässä työssä implementoitavalle sekvenssille ja mahdollistavat d-PFG -tulosten kvalitatiivisen vertailun *ex vivo*- ja *in vivo* -olosuhteiden välillä. Tässä luvussa esitetään kaikkien mittausten toteutus, kuten laitteisto, kuvantamiskohteet ja -parametrit sekä mittaustulosten käsittely.

5.1 Magneettikuvauslaitteistot

Optimointi- ja *in vivo* -mittauksissa käytettiin Bruker Pharmascan 7T -magneettikuvauslaitteistoa (Bruker Biospin MRI GmbH, Ettlingen, Saksa), joka on Itä-Suomen yliopiston biolääketieteellinen NMR -tutkimusryhmän uusiin magneettikuvauslaitteisto. Se koostuu 7 T:n horisontaalisesta magneetista (kuva 5.1), joka on yhdistetty Brukerin omaan konsoliin. Lähetinkelana toimi kvadratuurivolyymikela ja vastaanottokelana rottien kuvantamiseen tarkoitettu kvadratuuripintakela.

Ex vivo -vertailumittauksessa käytettiin 9,4 T:n vertikaalista magneettia (Oxford Instruments PLC, Abingdon, Iso-Britannia) (kuva 5.1) kytkettynä Varian DirectDrive -konsoliin. Lähetys- ja vastaanottokelana käytettiin 20 mm:n kvadratuurivolyymikelaa (Rapid Biomedical GmbH, Rimpfing, Saksa).

Molemmat työssä käytetyistä magneeteista ovat tyypiltään suprajohtavia sähkömagneetteja. Vaikka niiden tuottamat magneettikentät ovat erittäin voimakkaita, niistä ei ole haittaa eläimille tai biologiselle kudokselle. Biologinen kudos on diamagneettista, eivätkä magneettikentän aiheuttamat voimat ole suuria kudokseen normaalisti kohdistuviin mekaanisiin ja hemodynaamisiin voimiin verrattuna. Satojen teslojen suuruusluokan kentissä voisi olla teoreettinen mahdollisuus esimerkiksi hermojen johtavuuden tai solukalvon ionikuljetuksen muutoksiin, mutta niin korkeita kenttiä ei käytännössä edes voida käyttää. Myöskään pidemmän aikavälin haittavai-

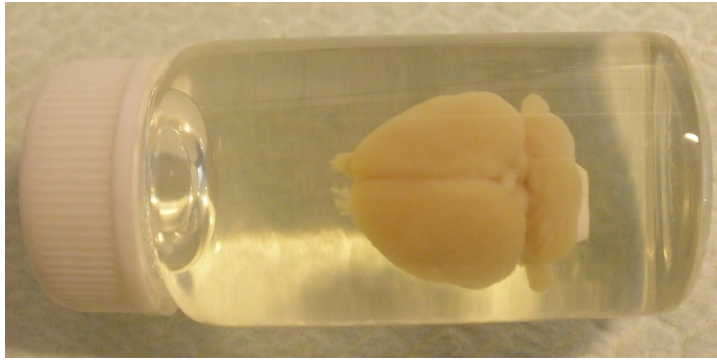


Kuva 5.1: Mittauksissa käytetyt magneettikuvauslaitteet. Vasemmalla *in vivo* -mittauksissa käytetty Bruker Pharmascan 7 T horisontaalinen magneetti, oikealla *ex vivo* -vertailumittauksessa käytetty Oxford Instruments 9,4 T vertikaalinen magneetti.

kutuksia esimerkiksi koe-eläinten käytöksessä tai jälkikasvussa ei ole työssä käytettyjen magneettien vahvuusluokassa pystytty luotettavasti osoittamaan. (McRobbie et al. 2007, s. 197-199)

5.2 Kuvantamiskohteet

In vivo -mittauksissa käytettiin aikuisia Wistar-urosrottia ($n = 5$, $m = 450 - 500$ g, Itä-Suomen yliopisto, Valtakunnallinen koe-eläinkeskus), joista yhtä käytettiin *in vivo* -optimointimittauksissa neljä kertaa. Vertailumittaukset DTI:n ja d-PFG:n välillä suoritettiin neljällä rotalla, joista jokainen kuvattiin kerran kummallakin sekvenssillä. Rottia pidettiin omilla häikeissään 12 h valoisaa/12 h pimeää -syklissä siten, että valot syttyivät aina klo 07:00 aamulla. Eläinhuoneen lämpötila oli $22 \pm 1^\circ\text{C}$, ilman-
 kosteus 50-60 % ja eläimillä oli jatkuvasti saatavilla ruokaa ja vettä. Kaikki eläinko-
 keet olivat Etelä-Suomen lääninhallituksen eläinkoelautakunnan hyväksymiä ja su-
 o-
 ritettiin Euroopan komission direktiivin 86/609/EEC mukaisesti. DTI:n ja d-PFG:n
 välisessä vertailussa käytettyjä eläimiä käytettiin myös samaan aikaan meneillään ol-
 leessa seurantatutkimuksessa kontrollieläiminä, joten tässä työssä käytetään samaa
 eläinten numerointia kuin kyseisessä seurantatutkimuksessa. Käytettyjen eläinten
 tunnisteen olivat TM45, TM59, TM60 ja TM61. *Ex vivo* -laitteistolla tehdyssä ver-
 tailumittauksessa käytettiin näytteenä perfusoituja rotan aivoja. Perfusoitu rotta oli



Kuva 5.2: *Ex vivo* -optimointimittauksissa käytetty fantomi, joka koostui 8% gelatiinissa olevista rotan aivoista lasiputken sisällä.

yksi *in vivo* -mittauksissa käytetyistä eläimistä (TM45) ja se perfusoitiin kierrättämällä rotan elimistössä 0,9 % NaCl-liuosta 2 min (30 ml/min) ja 4 % paraformaldehydiliuosta 20 min (30 ml/min). Implementoidun d-PFG-sekvenssin optimointimittauksissa käytettiin aluksi *ex vivo* -fantomia, joka koostui lasiputkessa olevista rotan aivoista (kuva 5.2) säilöttynä isotrooppiseen geeliin (8% gelatiini).

5.3 Mittausten toteutus

5.3.1 Optimointimittaukset

Ex vivo -optimointimittauksissa käytetty fantomi asetettiin rotille tarkoitettuun eläinpidikkeeseen ja tuettiin alapuolelta pehmusteiden avulla siten, että se asettui mahdollisimman tukevasti ja suorassa vastaanottokelaa vasten. Optimointimittauksia tehtiin viisi ja joka kerran jälkeen kuvantamisparametreja muutettiin, jotta saavutettaisiin mahdollisimman hyvä kompromissi kuvanlaadun ja mittausajan välillä. *Ex vivo* -optimointimittauksissa käytetyt parametrit on koottu taulukkoon 5.1.

In vivo -optimointimittauksia varten eläin nukutettiin anestesiakammiossa, johon johdettiin n. 5% isofluraania (Baxter Oy, Suomi) N₂/O₂ (70%/30%) -kaasuseoksessa. Kun eläin oli menettänyt oikaisurefleksinsä, isofluraanipitoisuutta laskettiin hie-
man ja eläimen anestesia-tilan vaikuttaessa tarpeeksi vakaalta se siirrettiin rotille tarkoitettuun eläinpidikkeeseen ja isofluraanipitoisuus laskettiin n. 2%:n ja se johdettiin eläimelle maskin kautta. Mittauksen aikana eläimet tuettiin eläinpidikkeeseen korvista ja anestesiamaškiin hampaista ja vastaanottokela asetettiin mahdollisimman tiiviisti eläimen pään päälle. Rottien eläinpidikettä lämmitettiin vesikierrolla toimivalla lämmityslaitteella ja eläimen lämpötilaa ja hengitystihyettä tarkkailtiin mittauksen aikana lämpötila- ja paineantureilla. Arvot pyrittiin pitämään välillä 35-37 °C ja 55-70 s⁻¹ lämmitys- ja anestesia-laitteita säätämällä. *In vivo* -optimointimittauksia tehtiin neljä ja kuvantamisparametreja säädettiin joka kerran

Taulukko 5.1: *Ex vivo* -optimointimittauksissa käytetyt parametrit. N_{DP} = datapisteiden lukumäärä, d_S = leikkeen paksuus, N_S = leikkeiden lukumäärä.

Mittaus	1	2	3	4	5
T_R (s)	2,8	2,5	2,5	2,5	2,5
T_E (ms)	65	42	42	42	42
N_A	32	64	64	64	64
T_{tot}	1 h 52 min	2 h 34 min	2 h 34 min	2 h 34 min	2 h 34 min
FOV (cm ²)	3 x 3	2,11 x 2,11	2,11 x 2,11	2,11 x 2,11	2,11 x 2,11
N_{DP}	128 x 128	192 x 128	192 x 128	192 x 128	192 x 128
Resoluutio (μm ²)	234 x 234	110 x 164	110 x 164	110 x 164	110 x 164
d_S (mm)	1,0	1,0	0,5	0,5	0,6
N_S	1	1	1	7	10
Δ (ms)	20	13	13	13	13
δ (ms)	3,5	4	4	4	4
t_m (ms)	12,5	12,4	12,4	12,4	12,4
$2q$ (cm ⁻¹)	944	952	952	952	952

Taulukko 5.2: *In vivo* -optimointimittauksissa käytetyt parametrit.

Mittaus	1	2	3	4
T_R (s)	2,5	3,0	2,5	2,5
T_E (ms)	42	42	42	42
N_A	64	64	48	60
T_{tot}	2 h 34 min	3 h 4 min	1 h 57 min	2 h 25 min
FOV (cm ²)	2,11 x 2,11	2,11 x 2,11	2,11 x 2,11	2,11 x 2,11
N_{DP}	192 x 128	192 x 128	192 x 128	192 x 128
Resoluutio (μm ²)	110 x 164	110 x 164	110 x 164	110 x 164
d_S (mm)	0,6	0,5	1,0	1,0
N_S	10	12	7	7
Δ (ms)	13	13	13	13
δ (ms)	4	4	4	4
t_m (ms)	12,4	12,4	12,4	12,4
$2q$ (cm ⁻¹)	952	952	952	952

jälkeen optimaalisemmiksi. Käytetyt *in vivo* -optimointiparametrit on esitetty taulukossa 5.2.

Eläimet asetettiin magneettiin pää edellä anteriorinen-posteriorinen -akseli magneetin pääakselin suuntaisesti. Erityistä huomiota kiinnitettiin siihen, että eläin asettuu mahdollisimman suoraan magneettikuvauslaitteen koordinaatistoon nähden. Asento tarkistettiin ottamalla niin sanotut scout-kuvat ennen varsinaista mittaus- ta ja tarvittaessa asentoa korjattiin suuremmaksi. Scout-kuvia hyödynnettiin myös leikkeiden asettamisessa oikeaan kohtaan.

5.3.2 Lopulliset *in vivo* -mittaukset

Kuvantamisprotokolla ja -parametrit pidettiin d-PFG:n osalta samoina, joihin oli päädytty *in vivo* -optimointitesteissä. DTI-mittauksissa käytettiin jo aikaisemmissa tutkimuksissa optimoituja parametreja. Molempien *in vivo* -mittausprotokollien parametrit on koottu taulukkoon 5.3.

Kuten taulukosta 5.3 huomataan, d-PFG- ja DTI-mittausten resoluutiot eroavat toisistaan. Tämä johtui yksinkertaisesti inhimillisestä virheestä, sillä kun optimointimittauksissa muutettiin datamatriisin dimensioita vastaamaan DTI-sekvenssiä, ei huomattu muuttaa FOV:in kokoa samassa suhteessa. Tästä johtuen d-PFG-sekvenssin resoluutio on erilainen luku- ja vaihesuunnissa. Kuvat kuitenkin skaalattiin jälkeensä samanleveyisiksi DTI-kuvien kanssa, jotta niitä on helpompi vertailla keskenään.

5.3.3 *Ex vivo* -vertailumittaus

Ex vivo -vertailumittauksessa käytetyt aivot asetettiin sisähalkaisijaltaan 13 mm:n teflonputkeen siten, että aivojen anteriorinen-posteriorinen -akseli oli ulkoisen magneettikentän suuntaisesti. Putki täytettiin perfluoropolyetyleenillä (Galden) ja aivot pyrittiin tukemaan paikalleen putkeen asetettujen kahden muovirenkaan avulla. Tämän jälkeen putki asetettiin volyymikelan sisälle siten, että aivot osuivat mahdollisimman hyvin magneetin isosentrin kohdalle. Myös *ex vivo* -vertailumittauksessa näyte pyrittiin asettamaan magneetin mahdollisimman suorassa gradienttikoordinaatistoon nähden ja suoruuks sekä leikkeiden paikka tarkistettiin scout-kuvien avulla.

Ex vivo -vertailumittauksen parametrit on koottu taulukkoon 5.4. Perfusoinnin ja mittauksen välisenä aikana aivoja säilytettiin jääkaapissa NaCl-liuoksessa (9 mg/ml, Baxter Oy, Suomi) niiden säilyvyyden takaamiseksi.

Taulukko 5.3: *In vivo* -d-PFG ja -DTI-mittauksissa käytetyt parametrit. N_{dir} = diffuusiogradienttisuuntien lukumäärä.

	d-PFG	DTI
T_R (s)	2,5	2,5
T_E (ms)	42	30
N_A	60	32
T_{tot}	2 h 25 min	2 h 20 min
FOV (cm ²)	2,11 x 2,11	1,40 x 2,11
N_{DP}	128 x 192	128 x 192
Resoluutio (μm^2)	110 x 164	110 x 110
d_S (mm)	1,0	0,5
N_S	7	14
Δ (ms)	13	11
δ (ms)	4	4
t_m (ms)	12,4	-
N_{dir}	13	21
b (s/mm ²)	-	1000
$2q$ (cm ⁻¹)	952	-

Taulukko 5.4: *In vivo* ja *ex vivo* -d-PFG-mittauksissa käytetyt parametrit.

	<i>In vivo</i> d-PFG	<i>Ex vivo</i> d-PFG
T_R (s)	2,5	3,0
T_E (ms)	42	60
N_A	60	8
T_{tot}	2 h 25 min	11 h 5 min
FOV (cm ²)	2,11 x 2,11	1,8 x 1,8
N_{DP}	128 x 192	128 x 128
Resoluutio (μm^2)	110 x 164	140 x 140
d_S	1,0	0,75
N_S	7	15
Δ (ms)	13	20
δ (ms)	4	4
t_m (ms)	12,4	2,0
N_{dir}	13	13
$2q$ (cm ⁻¹)	952	1115

5.4 Mittaustulosten käsittely

5.4.1 Värikarttojen laskeminen

Magneettikuvauslaitteesta saatavat raakadatakuvat ovat harmaasävykuvia ja yhdestä mittauksesta saadaan leikettä kohden yksi ilman diffuusiogradientteja mitattu b_0 -kuva sekä yksi kuva kutakin gradienttisuuntaa kohden. Kuvien analysointiin käytettiin tutkimusryhmässä itse kehitettyä Matlabin Aedes-työkalua, jonka lisäksi DTI-värikarttojen (FA ja DEC) laskemiseen käytettiin FSL-ohjelmistoa¹ (Analysis Group, FMRIB, Oxford, Iso-Britannia). DTI-värikartat keskiarvotettiin Matlabin avulla siten, että neljästätoista leikkeestä aina kaksi peräkkäistä keskiarvotettiin keskenään, jotta saatiin seitsemän leikettä, kuten d-PFG-mittauksista. Kaikille raakadatakuville tehtiin myös pyörrevirtakorjaukset FSL-ohjelmistolla ennen värikarttojen laskemista.

Aedeksen *dpfgrfit*-funktio laskee d-PFG-raakadatakuvista ensin normitetut intensiteettikuvat jokaista kulman Ψ arvoa vastaavaa kuvaa kohden, siten että

$$E_{norm}(\Psi) = \frac{E(\Psi)}{(E(\Psi = 0^\circ) + E(\Psi = 360^\circ))/2}. \quad (5.1)$$

Tämän jälkeen se sovittaa kaikista 13 eri suuntiin mitatuista kuvista saadun intensiteettidatan Levenberg-Marquardt -algoritmilla yhtälöön (3.24) ja muodostaa värikartat sovitettavista parametreista aE (näennäinen eksentrisyys), φ (residuaalivaihe) ja vakio C . Vakion C värikarttaa ei analysoitu, vaan saaduista kartoista muokattiin Matlabilla lopulliset analysoitavat värikartat (aE , $|aE|$ ja φ).

5.4.2 Signaali-kohinasuhteen määrittäminen

d-PFG-sekvenssin optimointimittausten kuvanlaatua arvioitiin silmämääräisen tarkastelun lisäksi laskemalla kuvien signaali-kohinasuhde. Se on mahdollista määrittää useammallakin tavalla, kuten alkuperäisistä raakadatakuvista tai lopullisista värikartoista. Tulosten kannalta kiinnostavin on lopullisen värikartan kuvanlaatu, mutta signaali-kohinasuhde määritettiin silti alkuperäisistä raakadatakuvista. Lopulliseen värikarttaan aiheutuu kohinaa alkuperäisen raakadatan lisäksi myös yhtälön sovituksessa dataan, joten alkuperäisiä raakadatakuvia tarkastelemalla nähtiin parhaiten kuvantamisparametrien muutosten vaikutus kuvanlaatuun.

Signaali-kohinasuhteet määritettiin Aedeksen tähän tarkoitukseen tehdyllä työkalulla, jonka avulla jokaisen optimointimittauksen ensimmäisestä diffuusiopainotetusta kuvasta ($\Psi = 0^\circ$) rajattiin signaalia edustava alue (mahdollisimman suuri

¹saatavissa: <http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/> [viitattu 10.2.2013]

alue koko leikkeen alueelta) sekä kohinaa edustava alue leikkeen ulkopuolelta. Tämän jälkeen Aedes jakaa alueiden keskimääräiset intensiteetit keskenään ja antaa SNR-arvon. Tällä tavoin saadut SNR-arvot olivat pääosin melko huonoja (5-7), mutta lopullisten värikarttojen SNR-arvot ovat korkeampia, sillä *dpfgrfit*-funktio käyttää värikarttojen laskemisessa kaikkia 13 suuntaa vastaavaa kuvaa, jolloin signaali-kohinasuhde paranee.

5.4.3 ROI-analyysit

Jotta uusia d-PFG:n tuottamia kontrastiparametreja voitiin vertailla DTI:n *FA*-arvoihin sekä aikaisempiin d-PFG-tutkimuksiin, valittiin sekä *in vivo* -mittausten sekä *ex vivo* -vertailumittauksen d-PFG- ja DTI-kuvista viisi erilaista aluetta (ROI, *region of interest*). Valitut alueet olivat aivokurkiainen (CC, *corpus callosum*) ja sisäkotelo (IC, *internal capsule*), jotka ovat valkeaa ainetta, sekä ventrobasaalinen kompleksi (VB, *ventrobasal complex*), hippokampuksen pykäläpoimu (DG, *dentate gyrus*) ja primäärinen somatosensorinen korteksi (S1, *primary somatosensory cortex*), jotka ovat harmaata ainetta. Käytetyt ROI-alueet ovat samoista anatomisista rakenteista kuin Miettisen et al. (2012) tekemässä *ex vivo*-vertailussa, mutta kooltaan hieman suurempia. Esimerkki *aE*-kartasta rajatuista ROI-alueista on esitetty kuvassa 5.3 ja alueiden tarkempi sijainti rotan aivokartassa on esitetty liitteessä C.

Alueet rajattiin Aedeksen ROI-työkalun avulla jokaisesta *in vivo* -mittauksesta saadusta värikartasta molemmista aivopuoliskoista ja niistä määritettiin *FA*-, *aE*-, $|aE|$ - ja φ -arvot, jotka keskiarvotettiin kaikkien eläinten kesken ja lisäksi määritettiin arvojen keskihajonta eri eläinten välillä. Lisäksi samanlainen ROI-analyysi tehtiin vertailun vuoksi myös *ex vivo* -vertailumittaukselle, minkä virherajoina käytettiin Aedeksen määrittämää ROI-alueiden arvojen sisäistä keskihajontaa. *Ex vivo* -näytettä ei mitattu DTI-sekvenssillä, joten *FA*-arvoja *ex vivo* -datasta ei sen vuoksi saatu.

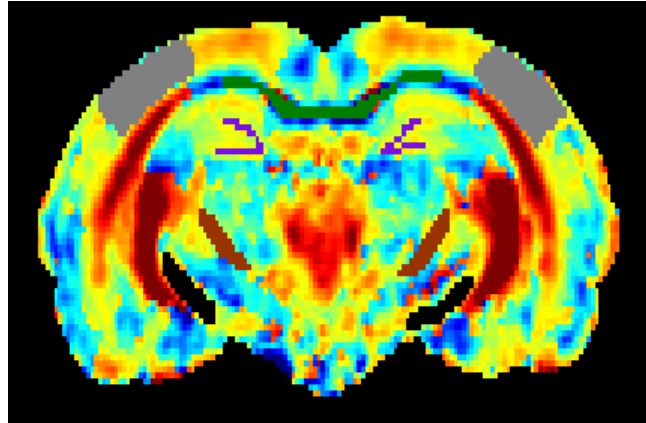
ROI-alueista määritettiin myös normalisoidut intensiteettikuvaajat kulman Ψ funktiona sekä *in vivo*- että *ex vivo* -d-PFG-datasta. Kuvassa 5.3 esitetyt ROI-alueet kopioitiin Aedeksessa kunkin eläimen värikartasta yhtälön (5.1) mukaisesti normalisoituihin intensiteettikuviin, jonka jälkeen kunkin alueen keskimääräisestä intensiteetistä voitiin piirtää kuvaaja kulman Ψ funktiona.

5.4.4 Vertailu histologiakuviin

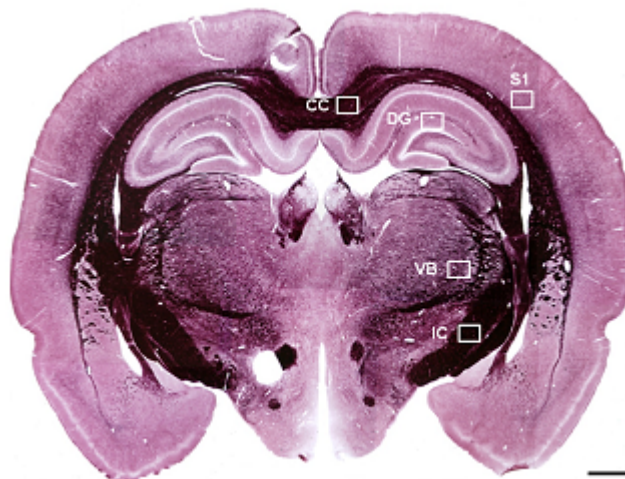
Jotta d-PFG:stä ja DTI:stä saatujen tulosten todenperäisyyttä voitiin arvioida, niitä verrattiin optisella mikroskoopilla otettuihin histologiakuviin samoista ROI-alueista kuin kuvassa 5.3. Kuvien tarkemmat kohdat histologialeikkeessä on merkitty kuvaan 5.4. Suurennokset kuvaan 5.4 merkityistä kohdista on esitetty tulosten yhteydessä

kuvassa 6.7.

Histologiakuvia ei käytännön syistä otettu tutkimuksessa käytettyjen eläinten aivoista, vaan aikaisemmin perfusoiduista yhden Wistar-urosrotan aivoista mahdollisimman samasta kohdasta kuin tässä tutkimuksessa analysoitu leike. Kuvista käy kuitenkin hyvin ilmi kyseisten alueiden suurimmat eroavaisuudet tämän tutkimuksen vaatimalla tasolla. Solunvärjäysmenetelmänä leikkeille oli käytetty kultakloridiliuoksella tehtyä myeliinivärjäystä, joka värjää kudoksen myeliiniä sisältävät osat violetiksi. Tämä mahdollistaa kudusrakenteiden järjestäytyneisyyden ja orientaation havaitsemisen mikroskooppisuurennoksista.



Kuva 5.3: Esimerkki aE-kartasta rajatuista viidestä eri ROI-alueesta. Harmaa: primäärinen somatosensorinen korteksi (S1), vihreä: aivokurkiainen (CC), violetti: pykäläpoimu (DG), ruskea: ventrobasaalinen kompleksi (VB), musta: sisäkotelo (IC).



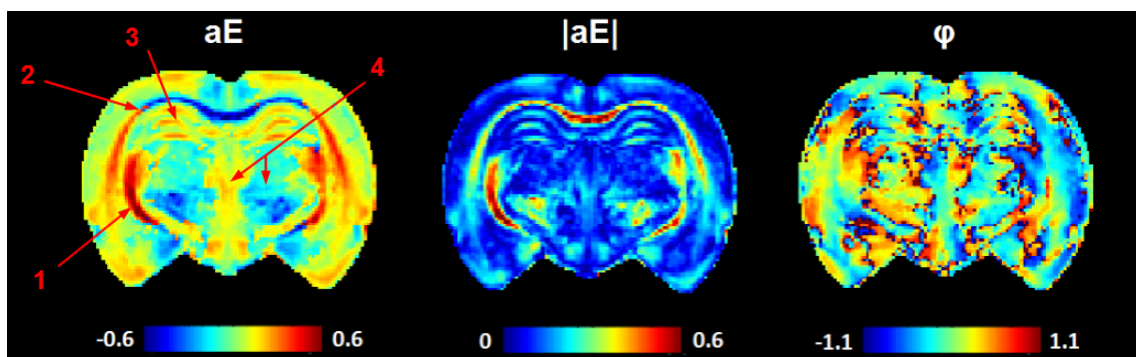
Kuva 5.4: Myeliinivärjätystä histologialeikkeestä otettujen kuvien sijainnit. CC: aivokurkiainen, DG: pykäläpoimu, S1: primäärinen somatosensorinen korteksi, VB: ventrobasaalinen kompleksi, IC: sisäkotelo. Mittajana: 1 mm. Suurennot on esitetty tulosten yhteydessä kuvassa 6.7.

6. TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

Tässä luvussa esitetään edellisessä luvussa kuvaillun mukaisesti saadut mittaustulokset. Aluksi esitetään lähtötilanteena toimineesta *ex vivo* -vertailumittauksesta lasketut värikartat. Tämän jälkeen esitetään uuden d-PFG-sekvenssin optimointitulokset värikarttoina, joista käy ilmi kuvanlaadun kehitys *ex vivo*- ja *in vivo* -optimointimittauksissa. Lopuksi tehdään vertailu d-PFG- ja DTI-sekvenssien välillä *in vivo* -olosuhteissa sekä vertaillaan implementoitua *in vivo* d-PFG-sekvenssiä jo olemassa olevaan *ex vivo* d-PFG-sekvenssiin sekä aikaisempiin d-PFG-tutkimustuloksiin.

6.1 *Ex vivo* -vertailumittaus

Kuvassa 6.1 on esitetty tutkimuksen lähtökohtana toimineen *ex vivo* -mittauksen aE -, $|aE|$ - ja φ -kartat. Niistä huomataan d-PFG-kartoille tyypillisiä piirteitä, kuten korkea aE -arvo ulkokotelossa (*external capsule*) sekä näköjuostevanan (*optic tract*) ja *fimbrian* muodostamalla alueella. Lisäksi tyypillinen piirre on aivokurkiaisen vahvasti negatiivinen aE -arvo sekä aE :n etumerkin vaihtuminen suurin piirtein kohdassa, jossa aivokurkiainen muuttuu ulkokapseliksi. Lisäksi aE -arvo on selvästi positiivinen tietyillä hippokampuksen alueilla, sekä aivojen keskellä olevassa talamuksessa. Mielenkiintoinen yksityiskohta on myös se, että aivokuoren alueet ovat enimmäkseen positiivisia aE -arvoltaan, kun taas talamuksen reuna-alueet ovat negatiivisia, vaikka molemmat ovat harmaan aineen alueita.



Kuva 6.1: Yhden leikkeen aE -, $|aE|$ - ja φ -kartat *ex vivo* -vertailumittauksesta. 1: näköjuostevana ja *fimbria*, 2: aivokurkiaisen ja ulkokotelon rajakohta, 3: hippokampus, 4: talamuksen keski- ja reunaosa.

Hankalin kartta tulkita kuvan 6.1 värikartoista on residuaalivaihe φ :n kartta, sillä sen arvot vaihtelevat paljon pienienkin alueiden sisällä ja niitä on vaikea liittää kahden muun kartan arvoihin. φ -kartasta huomataan kuitenkin, kuinka residuaalivaiheen arvot ovat melko tarkasti toistensa vastalukuja eri aivopuoliskojen välillä. Lisäksi huomataan, kuinka φ -arvot tuottavat kontrastia myös aivokuoren harmaan aineen alueiden välille.

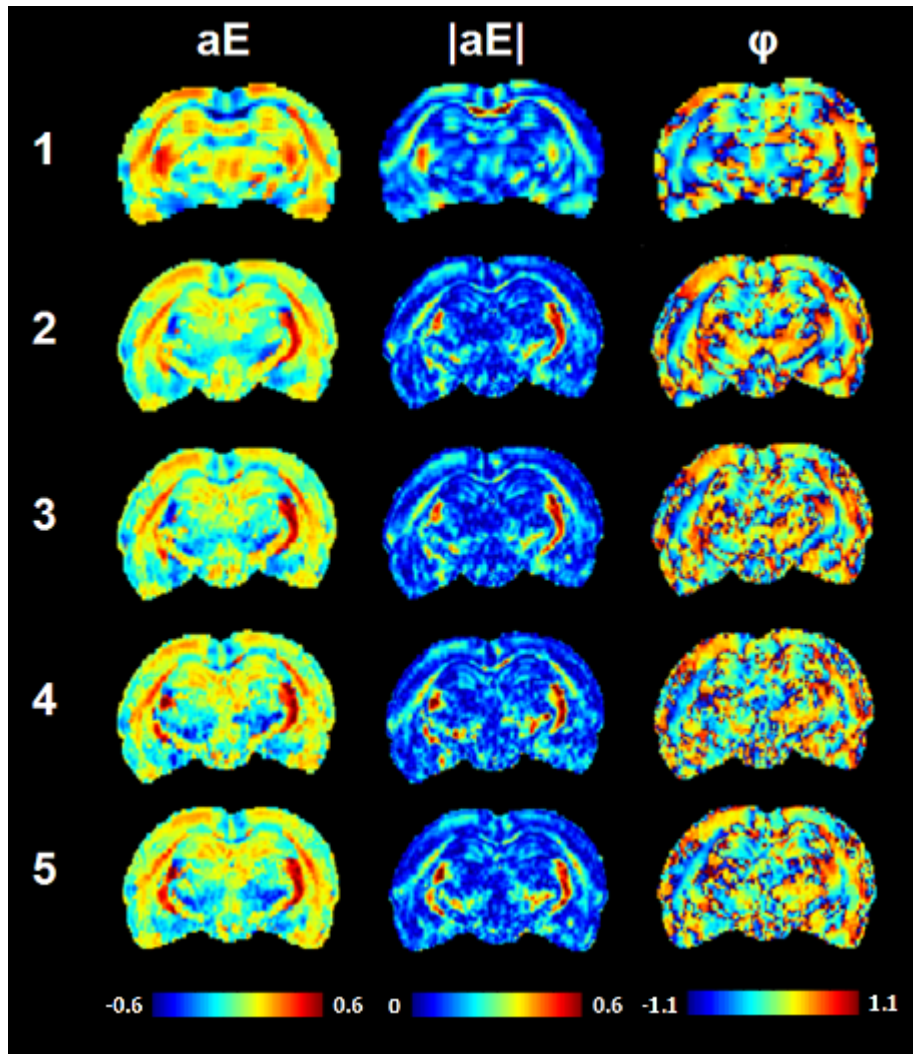
Kuvan 6.1 aivojen normaalia pyöreämpi muoto johtuu teflonputkesta, jossa aivot olivat *ex vivo* -mittauksen aikana. Putken halkaisija on hieman aivojen suurinta halkaisijaa pienempi, mistä johtuen putki puristaa aivoja hieman luonnollista pyöreämmiksi.

6.2 Optimointimittaukset

6.2.1 *Ex vivo*

Ex vivo -optimointimittauksista lasketut värikartat on esitetty kuvassa 6.2 ja niistä käy ilmi kuvanlaadun kehitys ensimmäisestä mittauksesta lähtien. Ensimmäisen mittauksen värikartassa resoluutio on vielä huono, mutta siitä havaitaan silti samoja piirteitä kuin *ex vivo* -vertailumittauksessa (kuva 6.1) sekä Shemeshin et al. (2012) aikaisemmassa tutkimuksessa (kuva 3.12) ja sen pohjalta sekvenssin voidaan olettaa toimivan oikein. Ensimmäisen mittauksen SNR oli 24,6, joka on ylivoimaisesti korkein koko työn aikana tehdyistä mittauksista. Tämä johtuu siitä, että pikselikoko ($234 \times 234 \mu\text{m}^2$) ja leikkeen paksuus (1,0 mm) olivat suuria, jotka johti suureen vokselitilavuuteen ($0,055 \text{ mm}^3$), minkä lisäksi myös T_R oli muita *ex vivo* -optimointimittauksia korkeampi. Näin ollen loppujen optimointimittauksen tavoitteeksi jäi parantaa resoluutiota, minimoida mittausaika ja pitää signaali-kohinasuhde silti siedettävällä tasolla. Signaali-kohinasuhteen pienenemistä pyrittiin kompensoimaan muun muassa kaksinkertaistamalla keskiarvotusten määrä mittauksissa 2-5 ($N_A = 64$) ja lyhentämällä kaikkuaikaa sekvenssin sallimaan minimiin ($T_E = 42 \text{ ms}$).

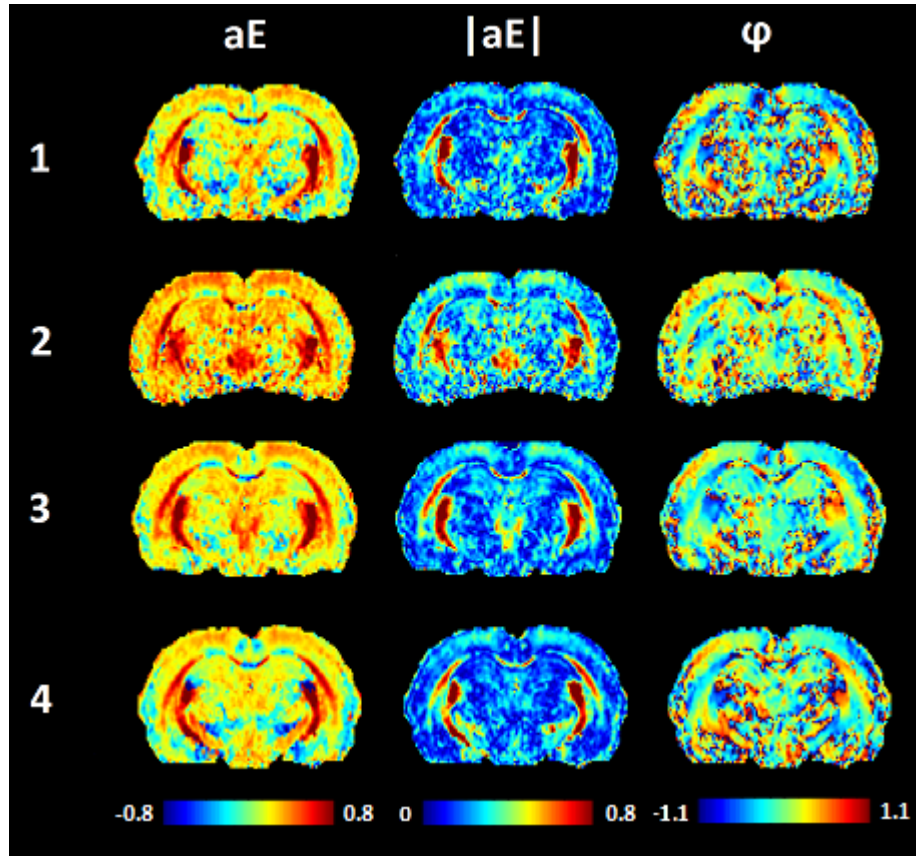
Erot mittausten 2-5 välillä ovat heikommin nähtävissä paljaalla silmällä, mutta esimerkiksi hippokampuksen alue erottuu viidennessä mittauksessa jo hieman muita mittauksia paremmin. Mittauksissa 2 ja 3 kuvannettiin vain yksi leike ja niiden SNR-arvot olivat 10,6 ja 10,1, vastaavasti. Mittaukset ovat muuten identtiset, mutta mittauksessa 3 leikkeen paksuus on puolet mittauksen 2 arvosta, mikä aiheutti vokselikoon ja sitä kautta SNR:n pienenemisen. Neljännessä mittauksessa kuvannettavia leikkeitä oli 7 ja viidennessä 10 kappaletta ja näiden mittausten vastaavat SNR-arvot olivat 7,4 ja 7,1. Mittauksen 5 kokonaiskesto oli 2 h 34 min ja viidennen mittauksen jälkeen parametrien, kuvanlaadun ja mittausajan välisen kompromissin todettiin olevan riittävän hyvä, jotta voitiin siirtyä sekvenssin *in vivo* -optimointiin.



Kuva 6.2: Värिकartat jokaisesta *ex vivo* -optimointimittauksesta. Useamman leikkeen mittauksissa (4 ja 5) on esitetty mahdollisimman samasta kohdasta oleva leike kuin yhden leikkeen mittauksissa (1-3).

6.2.2 *In vivo*

Kuvassa 6.3 on esitetty värिकartat kaikista *in vivo* -optimointimittauksista. Niistä huomataan, että *in vivo* -olosuhteissa kuviin tulee odotetusti selvästi enemmän kohinaa kuin *ex vivo* -olosuhteissa, sillä elävä eläin aiheuttaa magneettikenttään enemmän häiriöitä kuin geeliin säilötyt aivot. Tämän vahvistaa myös signaali-kohinasuhde, sillä vaikka viimeinen *ex vivo*- ja ensimmäinen *in vivo* -mittaus tehtiin identtisisillä parametreilla, olivat vastaavat SNR-arvot 7,1 ja 5,8. Toisessa mittauksessa toistoaikaa kasvatettiin 3,0 sekuntiin signaalin voimistamiseksi, leikkeiden lukumäärää kasvatettiin 12:a samalla pienentämällä leikkeen paksuutta 0,5 mm:n. Tämä johdatti kuitenkin liian pitkään mittaukseen (3 h 4 min) ja lisäksi leikkeiden lukumäärä alkoi olla laitteiston kestokyvyn rajoilla, mikä ilmeni esimerkiksi gradienttivahvisti-



Kuva 6.3: Värिकartat jokaisesta *in vivo* -optimointimittauksesta. Esitetty leike on mahdollisimman samasta kohtaa kuin *ex vivo* -optimointimittausten leikkeet kuvassa 6.2. *In vivo* -mittauksista saatiin aluksi selvästi *ex vivo* -mittauksia korkeampia aE -arvoja, minkä takia kuvan aE - ja $|aE|$ -kartoissa on käytetty laajempaa skaalaa, jotta erot saadaan selkeämmin esiin ja karttoja on helpompi vertailla *ex vivo* -vertailumittausten karttoihin.

mien voimakkaana lämpenemisenä. Kolmanteen mittaukseen T_R muutettiin takaisin 2,5 sekuntiin ja keskiarvotusten määrää vähennettiin 48:aan, jolloin mittausaika oli 1 h 57 min. Lisäksi leikkeiden lukumäärää vähennettiin seitsemään ja leikkeen paksuutta kasvatettiin 1,0 mm:n, jolloin neljännen mittauksen SNR oli 7,2. Koska *in vivo* -käytössä olevan DTI-sekvenssin kesto on 2 h 20 min, päätettiin d-PFG-sekvenssin keskiarvotusten lukumäärää vielä lisätä 60:een, jotta mittausten kestot olisivat samaa luokkaa. Tällä keinolla viimeisen *in vivo* -optimointimittauksen SNR saatiin nousemaan 8,3:een. Valitun leikkeen paksuuden ja resoluution ($110 \times 164 \mu\text{m}^2$) avulla mittauksen lopullinen vokselitilavuus on $0,018 \text{ mm}^3$.

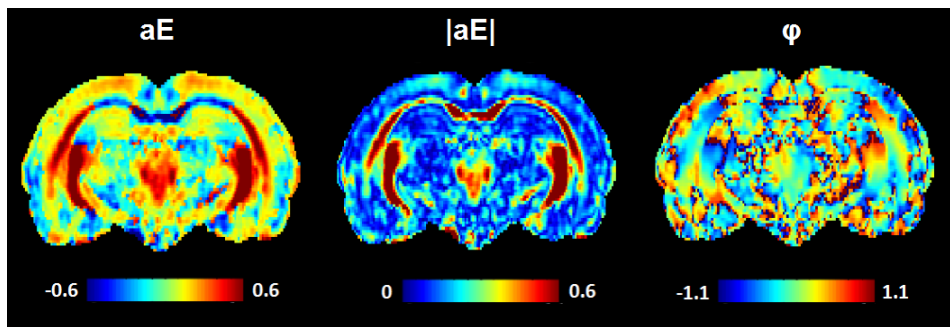
Lopulliseksi leikkeiden lukumääräksi valittiin vain seitsemän ja paksuudeksi 1,0 mm siksi, että käytössä olevassa DTI-sekvenssissä käytetään neljäätoista 0,5 mm:n paksuista leikettä. Tehtyjä DTI-mittauksia hyödynnetään myös toisessa meneillään olevassa tutkimuksessa, joten DTI:n leikkeiden lukumäärää tai paksuutta ei haluttu muuttaa. Koska sekvenssejä haluttiin kuitenkin vertailla keskenään, todettiin pa-

ras vertailukelpoisuus saatavan keskiarvottamalla kaksi peräkkäistä DTI-leikettä ja vertaamalla näin saatuja värikarttoja ja ROI-analysien arvoja d-PFG:n vastaaviin.

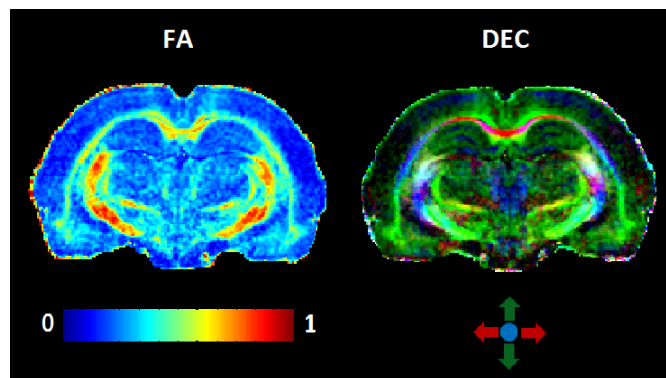
Jos verrataan kuvien 6.2 ja 6.3 viimeisiä mittauksia keskenään havaitaan, että *in vivo* -mittauksessa saadaan erottumaan jokseenkin samat yksityiskohdat kuin *ex vivo* -mittauksessa. Kuvia vertaillessa on kuitenkin huomioitava, että viimeisen *in vivo* -optimointimittauksen leikkeen paksuus on 0,4 mm paksumpi verrattuna viimeiseen *ex vivo* -optimointimittaukseen, jolloin rakenteiden yksityiskohdat keskiarvottuvat siihen suuremmasta tilavuudesta.

6.3 Lopullisten *in vivo* -mittausten värikartat

Kaikista kolmesta d-PFG-värikartasta on kuvassa 6.4 esitetty esimerkki eläimen TM60 yhdestä leikkeestä. Vastaavat DTI-mittauksen FA- ja DEC-kartat ovat kuvassa 6.5. d-PFG-värikartat kaikista seitsemästä leikkeestä löytyvät liitteestä D.



Kuva 6.4: Esimerkki eläimen TM60 yhden leikkeen *in vivo* d-PFG-värikartoista.



Kuva 6.5: Esimerkki eläimen TM60 yhden leikkeen DTI-värikartoista. DEC-kartassa diffuusion pääsuunnat on värikoodattu siten, että vihreä: ylös-alas, punainen: oikea-vasen ja sininen: kuvatason normaalin suunta.

Verrattaessa kuvan 6.1 *ex vivo* d-PFG-mittauksen värikarttoja kuvan 6.4 *in vivo* -mittausten vastaaviin karttoihin, niissä huomataan monia samoja, kappaleessa 6.1 mainittuja yksityiskohtia, kuten esimerkiksi erittäin vahvasti negatiivinen aE -arvo

aivokurkiaisessa, aE :n merkin muuttuminen aivokurkiaisien ja ulkokapselin rajalla, sekä voimakkaat aE -arvot näköjuostevanan ja *fimbrian* sekä talamuksen keskiosan alueilla. Lisäksi käytetyllä väriskaalalla *in vivo* -mittausten kontrasti vaikuttaisi olevan voimakkaampi, ja tietyt alueet, kuten esimerkiksi aivokuoren muuttuvat φ -arvot erottuvat *in vivo* -kuvista selkeämmin, erityisesti anteriorisemmista leikkeistä (Liite D). Tämän tarkempaa vertailua *in vivo*- ja *ex vivo* -karttojen välillä ei kuitenkaan kannata tehdä, sillä parametrit ja olosuhteet ovat hyvin erilaisia. Lisäksi erilainen leikkeen paksuus ja se, että leikkeet eivät ole täsmälleen samasta kohdasta, aiheuttavat joidenkin alueiden näkymisen erilaisina.

Värikartoista on löydettävissä yhtäläisyyksiä ja eroja myös d-PFG:n ja DTI:n välillä. Nopeasti tarkasteltuna suurimmat yhtäläisyydet vaikuttaisivat olevan $|aE|$ - ja FA -karttojen välillä, mutta lähempi tarkastelu paljastaa niistä myös monia eroja. FA -kartassa korkeimmat arvot sijaitsevat sisäkotelon alueella sekä *fimbrian* yläosassa, kun taas $|aE|$ -kartassa näkyvät hyvin voimakkaana näköjuostevana ja *fimbria* sekä aivokurkiainen. Lisäksi $|aE|$ -kartassa on hieman enemmän kontrastia aivokuoren ja hippokampuksen alueilla.

Tarkastelemalla absoluuttista aE -karttaa, saadaan lisää mielenkiintoista informaatiota verrattuna $|aE|$ -karttaan. Mielenkiintoisia ovat erityisesti kohdat, joissa aE :n etumerkki vaihtuu, kuten aivokurkiaisien muuttuminen ulkokoteloksi sekä aE -arvon tasainen pienentyminen positiivisesta negatiiviseksi liikuttaessa aivokuorta pitkin ylhäältä alas. Ero aivokurkiaisien ja ulkokapselin välillä on havaittavissa myös DEC-kartassa, jossa diffuusion pääakseli muuttuu kyseisessä pisteessä vasen-oikea-suuntaisesta kuvatason normaalin suuntaiseksi. Lisäksi samassa pisteessä havaitaan φ -kartassa residuaalivaiheen muuttuminen positiivisesta negatiiviseksi. Samanlainen, joskaan ei aivan yhtä voimakas kontrastiero huomataan myös talamuksen keskijä reunaosien välillä, ja myös näiden alueiden välillä on ero diffuusion pääsuunnassa DEC-kartassa.

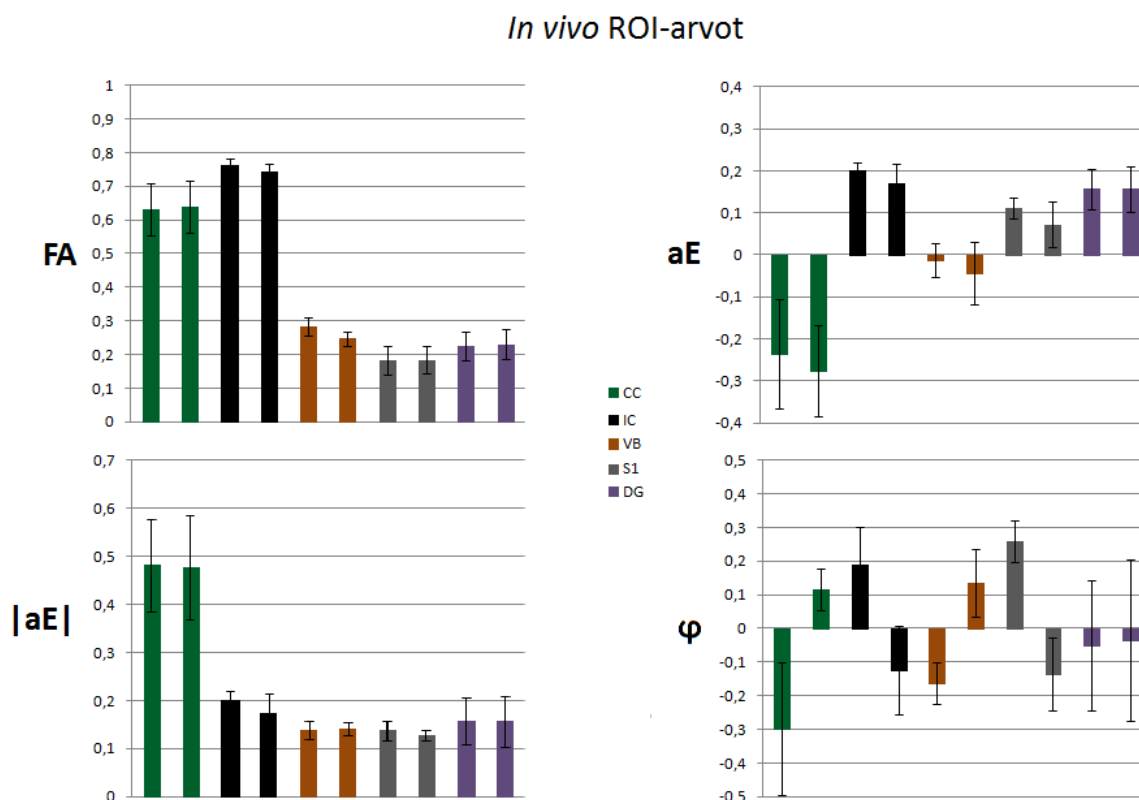
Edellä mainittujen yksityiskohtien perusteella voidaan esittää myös aE -arvon etumerkin olevan kytköksissä rakenteiden orientaatioon. Aivokuoren alueella aE -arvo ei näy olevan kytköksissä DEC-arvoihin, sillä se on harmaata ainetta, mistä johtuen DTI ei juurikaan pysty luomaan alueelle kontrastia. Lisäksi aivokuoren aE - ja φ -arvot eivät näytä korreloivan kovin hyvin keskenään, vaikka aivan aivojen keskilinjan molemmin puolin molemmissa havaitaan samantyyppiset vyöhykkeet.

Myös d-PFG:tä ja DTI:tä keskenään verrattaessa tulee muistaa, että vaikka d-PFG- ja DTI-kuvat ovat samasta eläimestä, ne on mitattu eri kerroilla, joten leikkeet eivät ole täsmälleen samassa kohdassa. Lisäksi FA - ja DEC-kartat on laskettu kahdesta peräkkäisestä yhdeksi keskiarvotetusta leikkeestä, mikä saattaa vääristää joitakin rakenteita. Silti kartoista on melko hyvin nähtävissä tyypillisimmät erot näiden kahden menetelmän välillä.

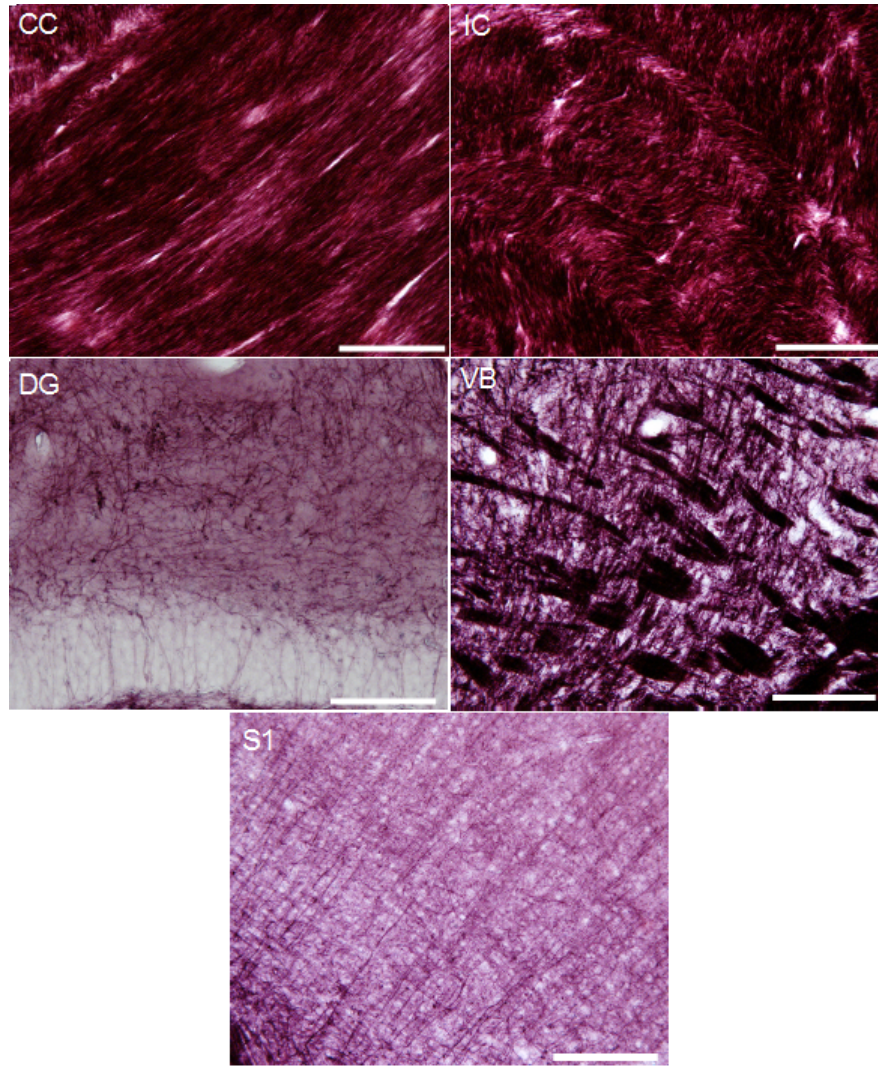
6.4 ROI-analyysit

6.4.1 *In vivo* DTI ja d-PFG

Valituista viidestä ROI-alueesta (kuva 5.4 ja liite C) lasketut FA -, aE -, $|aE|$ - ja φ -arvot sekä keskihajonta eri eläinten välillä on esitetty kuvassa 6.6 erikseen jokaiselle alueelle sekä vasemmalle että oikealle aivopuoliskolle. Kuvassa 6.7 on esitetty kuvan 5.4 ROI-alueiden mikroskooppisuurennot. Kuvasta 6.6 huomataan, että FA -arvoissa on odotetusti suuri ero valkean aineen (CC ja IC) ja harmaan aineen (VB, S1 ja DG) alueiden välillä. Jos otetaan huomioon arvojen hajonta, ei kahden valkean tai kolmen harmaan aineen alueilla ole kuitenkaan juurikaan keskinäisiä eroja. $|aE|$ -arvot mukailevat FA -arvoja harmaassa aineessa, mutta valkeassa aineessa aivokurkiaisien ja sisäkotelon välillä on selvä ero. Nämä alueet eroavat myös kuvan 6.7 mikroskooppisuurennotusten perusteella toisistaan. Aivokurkiaisien rakenteet ovat suurennotuksen perusteella voimakkaasti samansuuntaisia, kun taas sisäkotelon alueella rakenteissa on havaittavissa jonkin verran aaltoilua ja rakenteiden risteämistä. Näin ollen myös *in vivo* -mittauksissa päädyttiin samaan tulokseen valkean



Kuva 6.6: Pylväsdiagrammit jokaisesta *in vivo* -mittausten ROI-alueesta. Vasen palkki kuvaa vasemman aivopuoliskon aluetta ja oikea palkki oikean aivopuoliskon vastaavaa aluetta. Virhejanat kuvaavat arvojen keskihajontaa neljän eri eläimen kesken.



Kuva 6.7: Mikroskooppisuurennot histologialeikkeistä. CC: aivokurkiainen, IC: sisäkotelo, DG: pykäläpoimu, S1: primäärinen somatosensorinen korteksi, VB: ventrobasaalinen kompleks. Mittajana: CC, VB ja S1 200 μm , IC ja DG 100 μm .

aineen alueiden $|aE|$ -arvojen suhteen kuin Miettisen et al. (2012) tekemässä *ex vivo*-vertailussa.

Myös ROI-analyyseissa on mielenkiintoisinta tarkastella absoluuttista aE -arvoa. Vertaamalla aE -arvoja vastaavien alueiden FA -arvoihin, huomataan, kuinka d-PFG luo eroja sekä valkean aineen että harmaan aineen alueiden välille. Suurin ero on valkean aineen alueiden välillä eri etumerkistä johtuen, mutta myös harmaan aineen alueiden välillä on eroja. Lisäksi havaitaan, että joillakin alueilla (esimerkiksi CC ja VB) aE -arvon suuruus ei vastaa $|aE|$ -arvoa, mikä kertoo siitä, että näillä alueilla on sekä positiivisia että negatiivisia aE -arvoja. Varsinkin ventrobasaalisen kompleksin alueella huomataan kuvasta 6.7 sen sisältävän hyvin myeliinipitoisia alueita (tumman violetit, poikittaiset rakenteet) sekä niitä vastaan kohtisuorasti kulkevia rakenteita (vaaleammat violetit, pystysuuntaiset rakenteet). Lisäksi myös aivokurkiaisen

rakenne muuttaa suuntaansa siten, että sen alku ja loppu ovat vaakasuorassa, mutta välillä on yläviiston suuntainen rakenne.

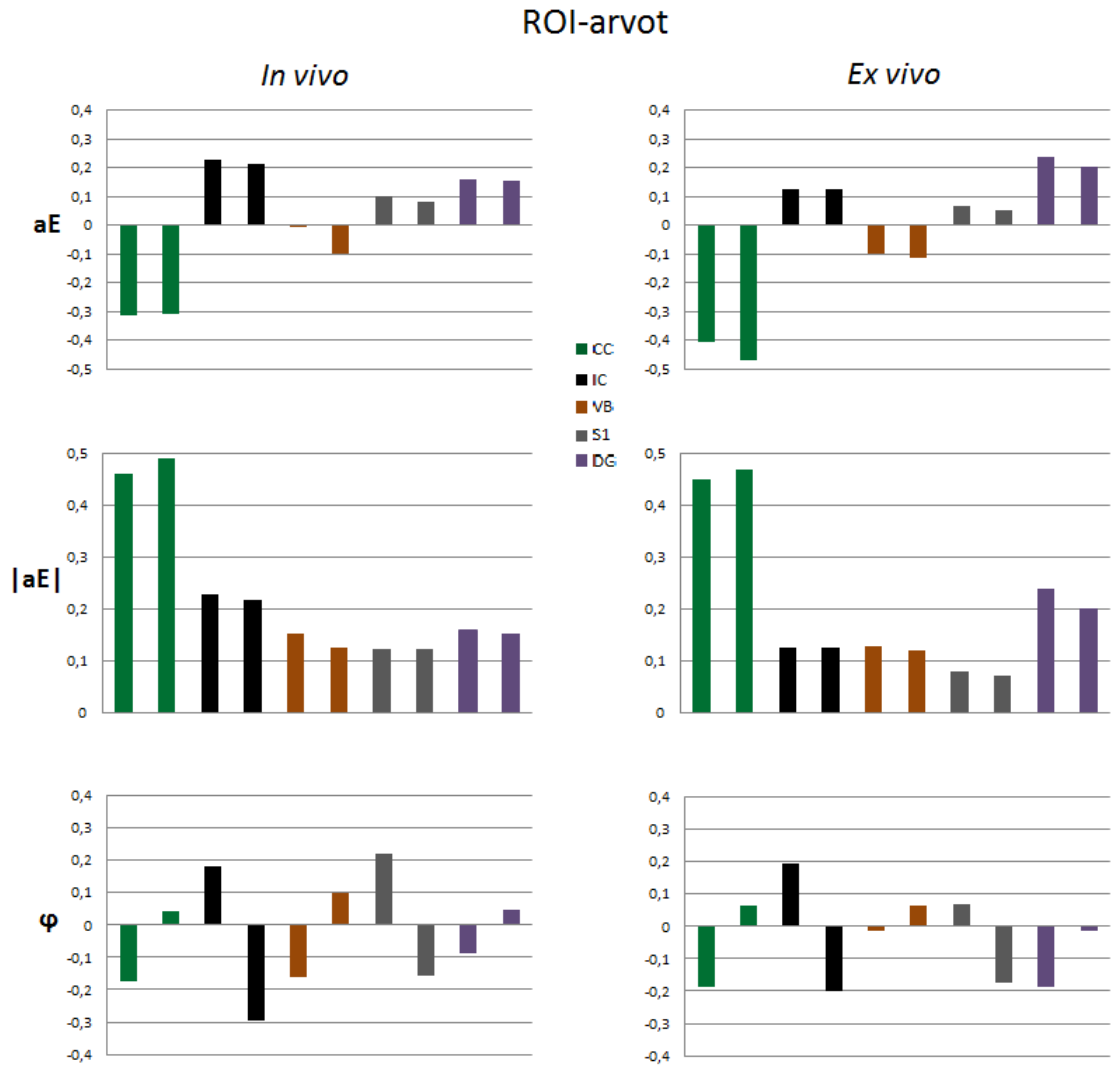
Kuten värikartoista, myös ROI-alueista on melko vaikea tulkita φ -arvoja, sillä kuten värikartoista huomattiin, ne vaihtuvat nopeasti pientenkin alueiden sisällä, mikä aiheuttaa arvoihin suurta hajontaa sekä alueiden sisälle että eri eläinten välille. Arvoista huomataan kuitenkin hyvin, kuinka eri aivopuoliskojen arvot ovat erimerkkisiä. Mielenkiintoista on kuitenkin se, että joillain alueilla (CC ja VB) vasen puoli on negatiivinen ja oikea positiivinen, kun taas toisilla alueilla (IC ja S1) arvot menevät toisin päin. Pykäläpoimun (DG) φ -arvoista on mahdotonta sanoa mitään erittäin suuren hajonnan takia. Yleisesti voidaan sanoa myös harmaan aineen alueiden *in vivo* ROI-arvojen vastaavan melko hyvin Miettisen et al. (2012) saamia *ex vivo* -tuloksia (kuva 3.13).

6.4.2 *In vivo* ja *ex vivo* d-PFG

Myös *in vivo* ja *ex vivo* d-PFG-mittausten ROI-alueita vertailtiin keskenään, jotta nähtiin, käyttäytyvätkö *in vivo* -mittausten arvot samalla tavalla kuin *ex vivo* -mittauksessa. Vertailut tehtiin vain kolmen d-PFG-arvon (aE , $|aE|$ ja φ) välillä, sillä *ex vivo* DTI-mittauksia ei tehty. *Ex vivo* -mittauksissa käytettiin yhden *in vivo* -mittauksissa käytetyn eläimen (TM45) aivoja, joten vertailuun valittiin *in vivo* -mittauksista vain tämä yksi eläin, sillä kuten kuvasta 6.6 huomattiin, hajonta eri eläinten välillä on suuri. Näin pystytään helpommin näkemään, noudattavatko arvot samaa trendiä *in vivo*- ja *ex vivo* -olosuhteissa. Vertailut *in vivo*- ja *ex vivo* -arvojen kesken on esitetty kuvassa 6.8. Arvoille käytettiin virherajana alueiden sisäistä keskihajontaa, mutta hajonta oli alueiden sisällä niin suurta, että virherajat jätettiin selkeyden vuoksi piirtämättä kuvaan 6.8. Keskihajonnat löytyvät liitteestä E taulukoista E.1 ja E.3.

Lisäksi *in vivo*- ja *ex vivo* -mittausten alkuperäisistä raakadatakuvista tehtiin normalisoidut intensiteettikuvat, joista piirrettiin kuvaajat normalisoidun intensiteetin muuttumisesta kulman Ψ funktiona. Nämä kuvaajat on valkean aineen alueille (CC ja IC) on esitetty kuvassa 6.9 ja harmaan aineen alueille (VB, SI ja DG) kuvassa 6.10. Vertailu *in vivo*- ja *ex vivo* -mittausten välillä on tehty saman eläimen (TM45) kesken kuin kuvassa 6.8.

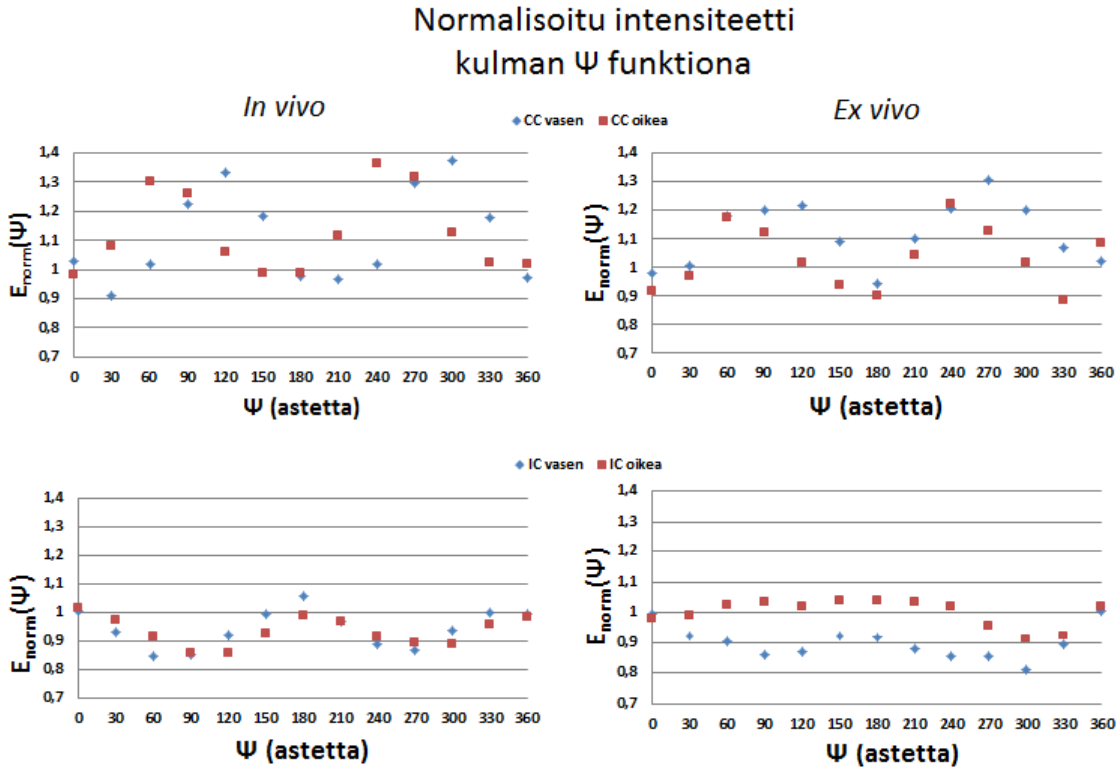
Kuvasta 6.8 nähdään, kuinka arvot näyttävät hyvin samankaltaisilta sekä *in vivo*- että *ex vivo* -olosuhteissa. Sekä aE - että φ -arvojen etumerkit ovat pääosin samoja ja $|aE|$ -arvojen keskinäiset suuruussuhteet ovat samaa luokkaa. Suurin ero on pykäläpoimun (DG) $|aE|$ - ja φ -arvoissa, joka todennäköisesti johtuu epätarkkuustekijöistä. Pykäläpoimu on kapea alue, jonka rajaaminen värikartasta luotettavasti on hyvin vaikeaa, jolloin φ -arvojen nopea vaihtelu aiheuttaa helposti virhettä arvoihin. *Ex vivo* -mittausten arvot noudattavat hyvin samaa trendiä kuin Miettisen et



Kuva 6.8: Vertailu jokaisesta ROI-alueesta *in vivo*- ja *ex vivo* -mittausten välillä samasta eläimestä (TM45). Vasen palkki kuvaa vasemman aivopuoliskon aluetta ja oikea palkki oikean aivopuoliskon vastaavaa aluetta.

al. (2012) tutkimuksessa (kuva 3.13).

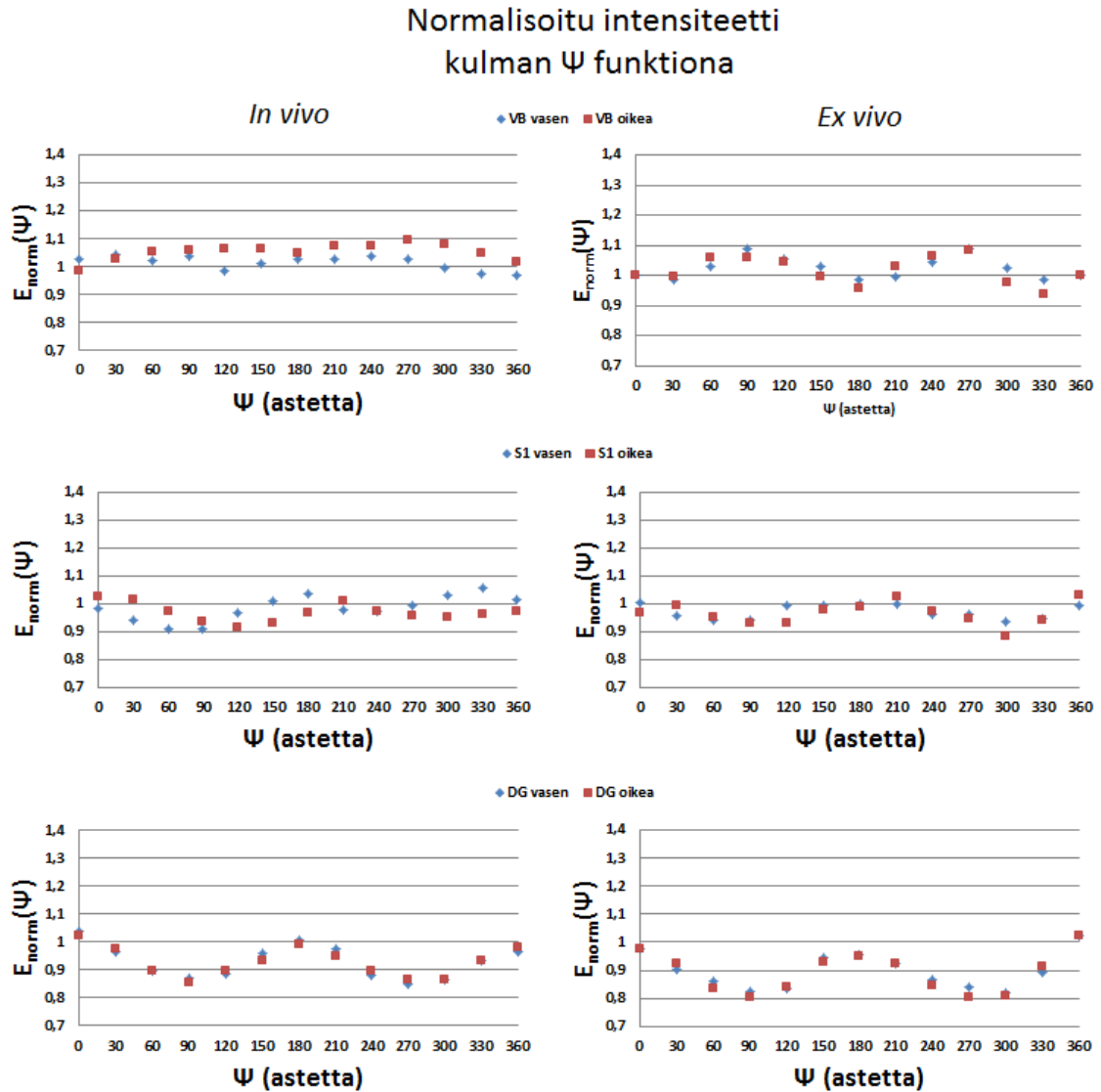
Valkean aineen intensiteettikäyrästä (kuva 6.9) huomataan, kuinka kummallakin alueella on hyvin omanlaisensa tunnistettava intensiteettikäyrä. Aivokurkiaisien alueella (CC) suhteelliset intensiteettiarvot ovat pääsääntöisesti suurempia kuin yksi, ja maksimi-intensiteetti saavutetaan noin 90° :n ja 270° :n kohdalla, intensiteetin minimin ollessa 0° :n, 180° :n ja 360° :n kohdalla, vaihesiirrot huomioiden. Vaihesiirrot eri aivopuoliskoissa ovat noin $\pm 30^\circ$ symmetrisestä tilanteesta ($\varphi = 0^\circ$). Lisäksi käyrät vastaavat hyvin toisiaan *in vivo*- ja *ex vivo* -mittausten välillä. Saadut intensiteettikäyrät ovat hyvin samanmallisia kuin Shemeshin et al. (2012) tutkimuksessaan aivokurkiaisien alueelta saamat käyrät (kuva 3.11), joskin täytyy muistaa,



Kuva 6.9: *In vivo* -mittausten suhteelliset intensiteettikuvaajat valkoisen aineen ROI-alueilta CC (aivokurkiainen) ja IC (sisäkapseli).

että kuvassa 3.11 käytetty leike on anteriorisemmasta kohdasta aivoja kuin tässä tutkimuksessa käytetty ja rajattu alue on pienempi. Sisäkapselin (IC) intensiteettikäyrä on päinvastainen ja amplitudiltaan hieman pienempi kuin aivokurkiuaisessa, mikä voitiin päätellä jo alueiden aE -arvoista. Myös sisäkapselin intensiteettikäyrissä havaitaan vaihesiirto, joka on hieman pienempi kuin aivokurkiuaisessa. Lisäksi vastaavuus *in vivo*- ja *ex vivo* -mittausten välillä on hieman heikompi, sillä 0° :n, 180° :n ja 360° :n arvot eivät vastaa *ex vivo* -mittauksessa yhtä hyvin toisiaan kuin *in vivo* -mittauksessa.

Harmaan aineen intensiteettikäyrillä (kuva 6.10) on pääsääntöisesti pienempi amplitudi kuin valkean aineen alueilla, mikä vastaa niiden pienempiä aE -arvoja. Pääsääntöisesti harmaan aineen alueilla käyrien tulkitseminen on hieman vaikeampaa niiden pienemmän amplitudin takia. Niissä on myös enemmän eroavaisuuksia vaihesiirron suuruudessa *in vivo*- ja *ex vivo* -mittausten välillä, varsinkin S1-alueella, jossa *in vivo* -mittauksessa on hyvin selvä vaihesiirto, mutta *ex vivo* -mittauksessa sitä ei ole käytännössä lainkaan. Sen sijaan DG-alueella vaihesiirto on molemmissa mittauksissa lähes nolla ja *in vivo*- ja *ex vivo* -käyrät vastaavat muutenkin toisiaan erinomaisesti.



Kuva 6.10: *In vivo* -mittausten suhteelliset intensiteettikuvaajat harmaan aineen ROI-alueilta VB (ventrobasaalinen kompleksi), S1 (primäärinen somatosensorinen korteksi) ja DG (pykäläpoimu).

6.5 Virhelähteet ja luotettavuus

Tutkimustuloksia tulkittaessa tulee ottaa huomioon, että tutkimuksen tarkoitus ei ollut tuottaa kvantitatiivisesti tarkkoja tuloksia d-PFG-menetelmällä. Sen sijaan sen tarkoitus oli implementoida tutkimusryhmän käyttöön *in vivo* -olosuhteissa toimiva d-PFG-sekvenssi ja varmistaa, että se toimii oikein ja antaa odotettuja tuloksia. Tuloksissa on virhettä, joka on aiheutunut erilaisista parametreista *in vivo* -DTI:n ja -d-PFG:n sekä *in vivo*- ja *ex vivo* -d-PFG:n välillä, kuten erilaisista leikkeen pak-suuksista, leikkeen paikan epätarkkuudesta sekä erilaisista resoluutioista ja keskiarvotusten määrästä. Lisäksi käyttämällä ROI-alueina pienempiä alueita koko kyseis-

ten anatomisten alueiden sijaan, olisi saatu tarkempia ROI-arvoja ja intensiteettikäyriä. Tulokset tarkentuisivat erityisesti alueilla, joiden rakenteiden orientaatio muuttaa suuntaa alueiden sisällä, kuten aivokurkiaisessa ja pykäläpoimussa. Nämä epätarkkuustekijät huomioiden voidaan silti edellä esitettyjen tulosten perusteella päätellä sekvenssin toimivan halutulla tavalla.

Mitä tulee kulmariippuvan d-PFG-menetelmän luotettavuuteen yleisellä tasolla, sen toistaiseksi suurin heikkous on rotaatio. Toisin kuin DTI, kulmariippuva d-PFG-sekvenssi ei ole invariantti rotaatiolle, vaan sen antamat tulokset riippuvat gradienttien rotaatiotasosta. Sen takia pienikin kallistus näytteen asennossa magneetissa aiheuttaa värikarttoihin epäsymmetriaa. Tämä on ongelma, sillä silloin ei voida tietää, johtuuko epäsymmetria kokonaan kallistuksesta vai eläimen aivopuoliskojen anatomisista eroavaisuuksista. Näytteen asettaminen magneettiin täysin suoraan on vaikeaa ja aikaavievää varsinkin elävän eläimen kanssa toimittaessa, mikä heikentää menetelmän käytännöllisyyttä. Ongelma saattaisi ratketa, mikäli kallistus voitaisiin kvantifioida tarkasti ja nopeasti ja tehdä vastaava korjaus gradienttien suuntiin. Toinen lähestymistapa ongelmaan voisi olla menetelmän teoreettinen kehittäminen tensorilaskennan suuntaan, jolloin DTI:n tapaan menetelmästä saataisiin rotaation suhteen invariantti. Teoreettisia lähestymistapoja ovat kehittäneet esimerkiksi Finterbusch et al. (2008) ja Lawrenz et al. (2010), mutta niitä ei ole vielä sovellettu kokeellisiin mittauksiin.

Toinen asia, mikä tekee kulmariippuvasta d-PFG-menetelmästä vielä toistaiseksi epäluotettavan, on sen tuottamat parametrit ja niiden hyödyllisyys. Edellä esitetystä tuloksista huomattiin, että niiden avulla saadaan aikaiseksi joitakin mielenkiintoisia kontrasteja, jotka eivät ole mahdollisia DTI-menetelmällä. Parametrien huono puoli on kuitenkin se, että vielä ei tiedetä tarkasti, mitä ne kuvaavat. DTI:n laskemista FA- ja DEC-parametreista tiedetään tarkasti mitä ne tarkoittavat, sillä ne ovat teorian avulla johdettuja suureita. Sen sijaan d-PFG:n parametrit aE ja φ ovat yhtälön (3.24) sovituspäätelöparametreja, joiden avulla intensiteettidataa yritetään kuvata mahdollisimman hyvin. Funktion sovittamisessa dataan joudutaan kuitenkin aina tekemään kompromisseja, mikä puolestaan aiheuttaa tuloksiin epätarkkuutta. Myös tällä saralla d-PFG-menetelmä vaatii vielä tarkempaa teoreettista lähestymistapaa, simulaatioita sekä lisää käytännön kokeita ja vertailua muihin menetelmiin, jotta sen tuottamien parametrien todellinen tarkoitus saadaan selville.

7. JOHTOPÄÄTÖKSET JA SUOSITUKSET

Tutkimuksen päätavoite oli implementoida tutkimusryhmän *in vivo* -käytössä olevalle magneettikuvauslaitteelle toimiva d-PFG-sekvenssi. Vertaamalla saatuja d-PFG-tuloksia *ex vivo* -käytössä olevaan sekvenssiin sekä aikaisempiin tutkimustuloksiin, voidaan erilaiset parametrit ja mittausolosuhteet huomioon ottaen todeta sekvenssin toimivan oikein ja tuottavan odotettuja tuloksia. Työssä implementoidun sekvenssin suhteen on vielä paljon kehitys- ja optimointimahdollisuuksia. Sekvenssin koodia voidaan kehittää esimerkiksi siten, että sekoittumisajasta t_m saadaan itsenäinen, käyttäjän muuteltavissa oleva parametri. Lisäksi sekvenssi on tällä hetkellä pakotettu symmetriseksi, joten myöhemmissä tutkimuksissa voi olla tarvetta muuttaa se epäsymmetriseksi ($\delta_1 \neq \delta_2$, $\Delta_1 \neq \Delta_2$).

Verrattaessa *in vivo* d-PFG -tuloksia *in vivo* DTI -tuloksiin, havaittiin, että kulmariippuvalla d-PFG-menetelmällä on mahdollista tuottaa uudenlaisia kontrasteja sekä valkean että harmaan aineen alueiden välille. Tarkempia kvantitatiivisia tuloksia haluttaessa on kuitenkin syytä käyttää pienempiä ROI-alueita, sillä tuloksista havaittiin hajonnan ROI-alueiden sisällä olevan suurta. d-PFG on menetelmänä vielä verrattain uusi ja kehitysvaiheessa oleva, eikä sen tuottamien kontrastiparametrien tarkoitusta vielä täysin ymmärretä. Siksi niin teoreettiset kuin kokeellisetkin jatkotutkimukset niiden tarkoituksen selvittämiseksi ovat tarpeellisia, ennen kuin menetelmää voidaan täysin hyödyntää esimerkiksi DTI-menetelmän rinnalla.

Yksi merkittävä d-PFG-menetelmän heikkous havaittiin olevan sen herkkyyys näytteen rotaatiolle magneetissa, joka aiheuttaa värikarttoihin epäsymmetriaa. Tämä ongelma olisi hyvä saada ratkaistua mahdollisimman nopeasti, sillä se heikentää menetelmän käytännöllisyyttä ja luotettavuutta. Ratkaisu ongelmaan voisi olla joko käytännöllinen, kuten vastaavan korjauksen tekeminen gradientien suuntiin, tai teoreettinen, kuten menetelmän kehittäminen tensorilaskennan suuntaan. Kulmariippuvan d-PFG-sekvenssin heikkouksista huolimatta sen voidaan kuitenkin sanoa olevan lupaava menetelmä, joka kehittyessään luotettavammaksi voi olla tehokas työkalu aivokudoksen rakenteen karakterisoinnissa ja erilaisten aivosairauksien tunnistamisessa.

LÄHTEET

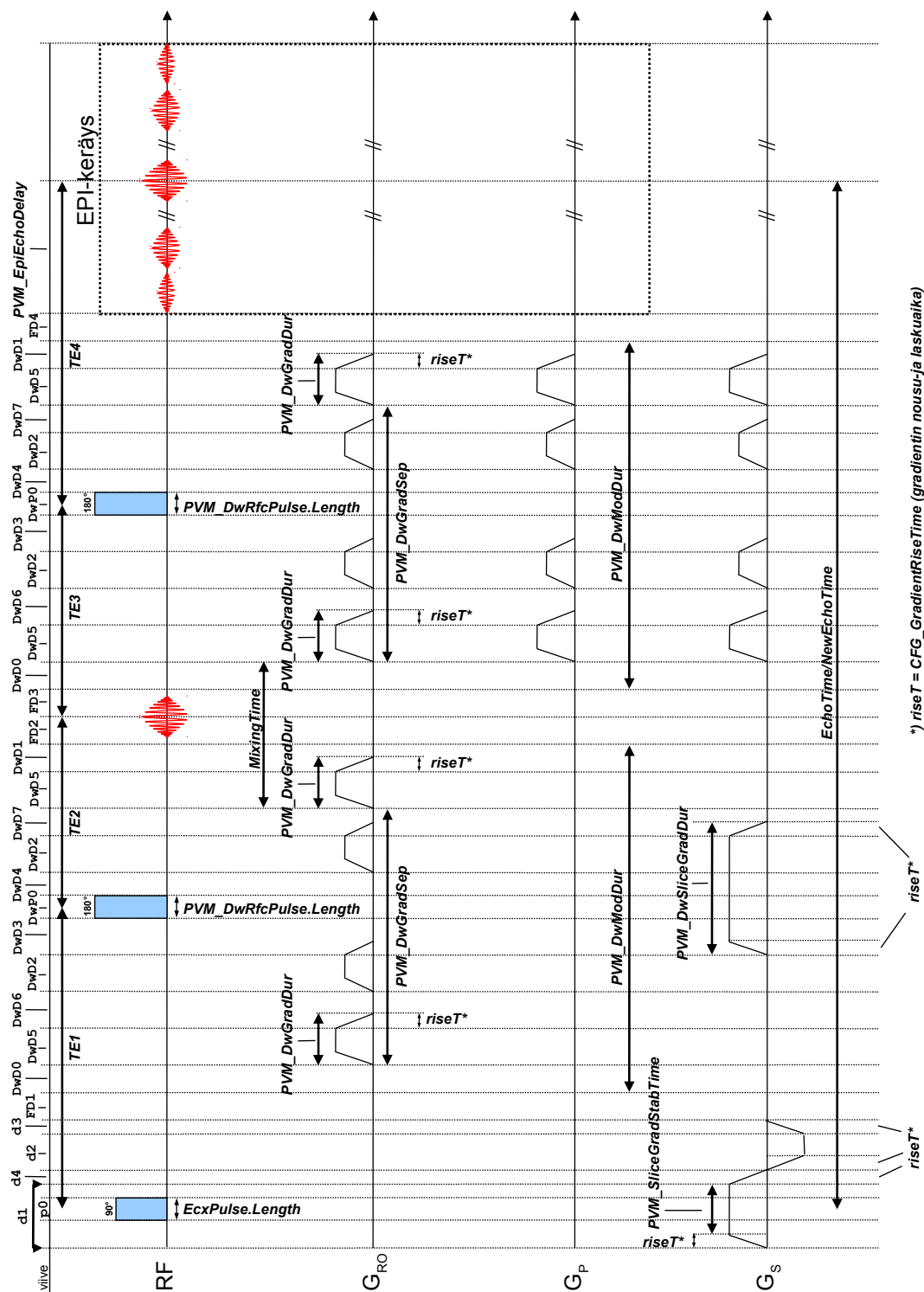
- Armoguum, C. Magnetic resonance imaging. Chapter 2 - MRI Hardware. [WWW][viitattu 12.2.2013]. IPEM training portfolio. Department of medical physics, Ninewells Hospital, Tayside university hospitals NHS trust. 10 p. Saatavissa: <http://www.medicalphysicist.co.uk/chapter2.doc>.
- Basser, P.J., Pajevic, S., Pierapoli, C., Duda, J & Aldroubi, A. 2000. In vivo fiber tractography using DT-MRI data. *Magnetic Resonance in Medicine*, 44, 4, pp. 625-632.
- Bernstein, M.A., King, K.F. & Zhou, X. J. 2004. *Handbook of MRI Pulse Sequences*. San Diego, USA, Elsevier Academic Press. 1017 p.
- Blink, E.J. 2010. MRI: Physics. [WWW][viitattu 12.2.2012]. Saatavissa: <http://www.mri-physics.net/bin/mri-physics-en-rev1.3.pdf>.
- Buxton, R.B. 2002. *Introduction to Functional Magnetic Resonance Imaging: Principles & Techniques*. Cambridge, UK, Cambridge University Press. 523 p.
- Callaghan, P.T. & Komlosh, M.E. 2002. Locally anisotropic motion in a macroscopically isotropic system: displacement correlations measured using double pulsed gradient spin-echo NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 40, 13, pp. S15 - S19.
- Chen, N., Qin, W., Wang, X. & Li, K. 2011. Time course of Hashimoto's encephalopathy revealed by MRI: Report of two cases. *Journal of Neurological Sciences*, 300, 1-2, pp. 169-172.
- Cheng, Y. & Cory, D.G. 1999. Multiple scattering by NMR. *Journal of American Chemical Society*, 121, 30, pp. 7935-7936.
- Chepuri, N.B., Yen, Y.F., Burdette, J.H., Li, H., Moody, D.M. & Maldjian, J., A. 2002. Diffusion anisotropy in the corpus callosum. *American Journal of Neuroradiology*, 23, 5, pp. 803-808.
- Cohen, M.S. 1998. Echo-planar imaging (EPI) and functional MRI. [WWW][viitattu 5.1. 2013]. Saatavissa: <http://www.brainmapping.org/MarkCohen/Papers/EPI-fMRI.html>.
- Conolly, S. 2007. MRI hardware. [WWW][viitattu 12.2.2013]. Saatavissa: http://cds.ismrm.org/ismrm-2007/files/Mon%20D02_Conolly.pdf.
- Cory, D.G., Garroway, A.N. & Miller, J.B. 1990. Applications of spin transport as a probe of local geometry. *Polymer Preprints*, 31, 1, pp. 149-150.

- Deb, A. 2012. Multiple sclerosis MR imaging and OCB. [WWW][viitattu 17.11.2012]. Saatavissa: <http://prep-pg.blogspot.fi/2012/04/multiple-sclerosis-mr-imaging-and-ocb.html>.
- Emory University, School of medicine, Biomedical Imaging Technology Center. 2005. Sequence diagrams. [WWW][viitattu 6.1.2013]. Saatavissa: http://bitc.bme.emory.edu/seq_dia.html.
- Finsterbusch, J. & Koch, M.A. 2008. A tensor approach to double wave vector diffusion-weighting experiments on restricted diffusion. *Journal of Magnetic Resonance*, 195, 1, pp. 23-32.
- Fishbein, K.W., McGowan, J.C. & Spencer, R.G. 2005. Hardware for magnetic resonance imaging. In: Filippi, M., De Stefano, N., Dousset, V. & McGowan, J.C. *MR imaging in white matter diseases of the brain and spinal cord*. Berlin, Germany, Springer Verlag. 487 p.
- Hashemi R.H., Bradley, W.G. & Lisanti, C.J. 2010. *MRI: The Basics*. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins. 385 p.
- Hiltunen, J., Hari, R., Jousmäki, V., Müller, K., Sepponen, R. & Joensuu, R. 2006. Quantification of mechanical vibration during diffusion tensor imaging at 3 T. *NeuroImage*, 32, 1, pp. 93-103.
- Hiltunen, J., Seppä, M. & Hari, R. 2007. Diffuusiotensorikuvaus hermorojien tutkimuksessa. *Duodecim*, 123, 15, pp. 1851-1858.
- Hoa, D. 2009. MRI step-by-step, interactive course on magnetic resonance imaging [WWW]. Montpellier, France, IMAIOS SAS. [viitattu 16.10.2012]. Saatavissa: <http://www.imaios.com/en/e-Courses/e-MRI>.
- Hornak, J.P. 2011. The Basics of MRI [WWW]. Henrietta, NY, Interactive Learning Software. [viitattu 3.10.2012]. Saatavissa: <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/inside.htm>.
- Horsefield, M.A., & Jones, D., K. 2002. Applications of diffusion-weighted and diffusion tensor MRI to white matter diseases - a review. *NMR in Biomedicine*, 15, 7-8, pp. 570-577.
- Komlosh, M.E., Horkay, F., Fredlin, R.Z., Nevo, U., Assaf, Y. & Basser, P., J. 2007. Detection of microscopic anisotropy in gray matter and in a novel tissue phantom using double pulsed gradient spin echo MR. *Journal of Magnetic Resonance*, 189, 1, pp. 38-45.

- Komlosh, M.E., Lizak, M.J., Horkay, F., Freidlin, R.Z. & Basser, P.J. 2008. Observation of microscopic diffusion anisotropy in the spinal cord using double-pulsed gradient spin echo MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 59, 4, pp. 803-809.
- Laitinen, T., Sierra, A., Pitkänen, A. & Gröhn, O. 2010. Diffusion tensor MRI of axonal plasticity in the rat hippocampus. *NeuroImage*, 51, 2, pp. 521-530.
- Lawrenz, M., Koch, M.A. & Finsterbusch, J. 2010. A tensor model and measures of microscopic anisotropy for double wave-vector diffusion-weighting experiments with long mixing times. *Journal of Magnetic Resonance*, 202, 1, pp. 43-56.
- McRobbie, D.W., Moore, E.A., Graves, M.J. & Prince, M.R. 2007. MRI from picture to proton. 2nd edition. New York, USA, Cambridge University Press. 393 p.
- Miettinen, T., Sierra, A., Laitinen, T., Sorvari, J. & Gröhn, O. A comparison between double-PFG MRI and DTI in *ex vivo* rat brain. *Proceedings in International Society for Magnetic Resonance in Medicine*. In press.
- Mitra, P.P. 1995. Multiple wave-vector extensions of the NMR pulsed-field-gradient spin-echo diffusion measurement. *Physical Review B Condensed Matter*, 51, 21, pp. 15074-15078.
- Mori, S., Zhang, J. 2006. Principles of Diffusion Tensor Imaging and Its Applications to Basic Neuroscience Research. *Neuron* 51, 5, pp. 527-539.
- Nelson, P. 2002. Biological Physics: Energy, Information, Life. Student version. Philadelphia, USA, University of Pennsylvania. 518 p.
- ParaVision 5.1 User's Manual. 2010. Method Programming. Ohjetiedosto. Germany, Bruker BioSpin MRI GmbH. 106 p.
- Paxinos, G. & Watson, C. 1998. The Rat Brain in Stereotactic Coordinates. Fourth Edition. San Diego, USA, Academic Press Ltd. 474 p.
- Ries, M., Jones, R.A., Basseau, F., Moonen, C.T.W. & Grenier, N. 2001. Diffusion tensor MRI of the human kidney. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 14, 1, pp. 42-49.
- Shemesh, N., Özarslan, E., Basser, P.J. & Cohen, Y. 2009. Measuring small compartmental dimensions with low-q angular double-PGSE NMR: the effect of experimental parameters on signal decay. *Journal of Magnetic Resonance*, 198, 1, pp. 15-23.

- Shemesh, N., Özarslan, E., Komlosh, M.E., Basser, P.J., Cohen, Y. 2010. From single-pulsed field gradient to double-pulsed field gradient MR: gleaning new microstructural information and developing new forms of contrast in MRI. *NMR in biomedicine* 23, 7, pp. 757-780.
- Shemesh, N., Barazany, D., Sadan, O., Bar, L., Zur, Y., Barhum, Y., Sochen, N., Offen, D., Assaf, Y. & Cohen, Y. 2012. Mapping apparent eccentricity and residual ensemble anisotropy in the gray matter using angular double-pulsed-field-gradient MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 68, 3, pp. 794-806.
- Shinha, S., Shinha, U. & Edgerton, V.R. 2006. In vivo diffusion tensor imaging of the human calf muscle. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 24, 1, pp. 182-190.
- Skorpil, M., Karlsson, M. & Nordell, A. 2004. Peripheral nerve diffusion tensor imaging. *Magnetic Resonance Imaging*, 22, 5, pp. 743-745.
- Stejskal, E.O. & Tanner, J.E. 1965. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *Journal of Chemical Physics*, 42, 1, pp. 288-292.
- Wang, Yao. 2013. MRI Instrumentation and Pulse Sequences. [WWW][viitattu 12.2.2013]. Polytecnic University, Brooklyn, NY, USA. Saatavissa: http://eeweb.poly.edu/~yao/EL5823/MRI_instrumentation_ch13.pdf.
- Westbrook, C., Roth, C.K. & Talbot, J. 2005. *MRI in Practice*. 3rd ed. Oxford, UK, Blackwell Publishing. 410 p.
- Wheeler-Kingshott, C.A.M., Barker, G.J., Steens, S.C.A, van Buchem, M.A. 2003. D: the Diffusion of Water. In: Tofts, P. (ed.) *Quantitative MRI of the Brain: Measuring Changes Caused by Disease*. West Sussex, England, John Wiley & Sons Ltd. 633 p.
- Young, H.D. & Freedman, R.A. 2000. *Sears and Zemansky's University Physics with Modern Physics*. 10th ed. International Edition. Addison-Wesley Publishing Company. 1513 p.
- Özarslan, E., Basser, P.J. 2008. Microscopic anisotropy revealed by NMR double pulsed field gradient experiments with arbitrary timing parameters. *Journal of Chemical Physics*, 128, 15, pp.
- Özarslan, E. 2009. Compartment shape anisotropy (CSA) revealed by double pulsed field gradient MR. *Journal of Magnetic Resonance*, 199, 1, pp. 56-67.

LIITE A: Kaaviokuva implementoidusta sekvenssistä



Kuva A.1: Kaaviokuva implementoidusta kulmariippuvasta d-PFG-sekvenssistä.

LIITE B: DpfgEpi.ppg-tiedosto

```

#include <MRI.include>
preset off

;counter of dummy scans (not acquired; DS set to 0)
define loopcounter lcDs
"lcDs = 11"

define delay FD1 = $TE_FillDelay1
define delay FD2 = $TE_FillDelay2
define delay FD3 = $TE_FillDelay3
define delay FD4 = $TE_FillDelay4

#include <PrepModulesHead.mod>
#include <DwiHead.mod>
#include <epiHead.mod>

lgrad slice = NSLICES
INIT_DEVICES
lgrad r3d<3d> = L[2]
zgrad Interleaving
zslice

subr DwiInit()

DiffL, 4u
#include <TriggerPerPhaseStep.mod>
slice, 10u fq8b:f1
#include <TriggerPerSlice.mod>
subr SatSlices()
subr FatSup()
;-----slice selection-----
d1 grad{(0)|(0)|(t0)} fq1:f1 gatepulse 1
(p0:sp0 ph0):f1
d4 groff
;-----slice rephase-----
d2 grad{(0)|(0)|(t1)+r3d(t2)}
d3 groff

```

```

;-----first dpfg block-----
FD1      groff
DwD0      groff
if(PVM_DwDirectScale == Yes)
{
    DwD5  grad{(0)|(0)|(0)}
}
else
{
    DwD5  grad{(PVM_DwGradAmp[0]*DPFG_FixedGradR0)|
                (PVM_DwGradAmp[0]*DPFG_FixedGradP)|
                (PVM_DwGradAmp[0]*DPFG_FixedGradS)}
}
DwD6      groff
DwD2      grad{(DPFG_FixedSpoil)|(0)|(0)}
DwD3      grad{(0)|(0)|(PVM_DwSliceGrad,no_scale)} DwF10:f1 gatepulse 1
DwP0:sp23  ph1
DwD4
DwD2      grad{(DPFG_FixedSpoil)|(0)|(0)}
DwD7      groff
if(PVM_DwDirectScale == Yes)
{
    DwD5  grad{(0)|(0)|(0)}
}
else
{
    DwD5  grad{(PVM_DwGradAmp[0]*DPFG_FixedGradR0)|
                (PVM_DwGradAmp[0]*DPFG_FixedGradP)|
                (PVM_DwGradAmp[0]*DPFG_FixedGradS)}
}
DwD1      groff
FD2      groff
FD3      groff
;-----
subr DwiPrep(ph1)
FD4      groff
        if "lcDs > 0" goto acqDs
#include <epi.mod>
goOn,2.5u

```

```

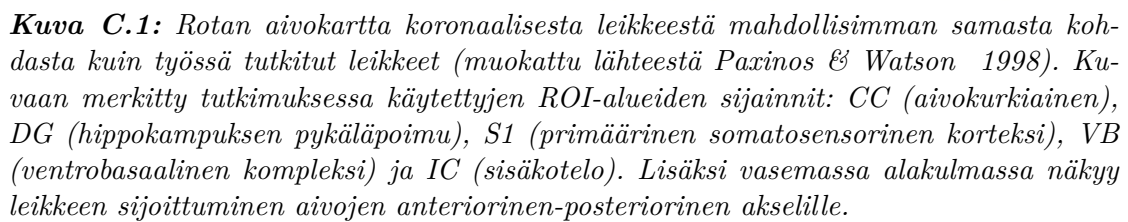
;-----slice loop-----
10u islice
d0    DwFl0.inc
lo to slice times NSLICES
1u zslice
;-----averaging loop-----
d5
"lcDs = lcDs - 1"
if "lcDs >= 0" goto DiffL      ;dummy scans
lo to DiffL times NA
;-----2d loop-----
1u igrad Interleaving
lo to DiffL times l0
1u zgrad Interleaving
;-----3d loop-----
if( ACQ_dim >= 3 )
{
1u igrad r3d
lo to DiffL times ACQ_size[2]
}
;-----diffusion loop-----
subr DwiLoop(DiffL)
;-----repetitions loop-----
lo to DiffL times PVM_NRepetitions
SETUP_GOTO(DiffL)
      goto bye

; ---- empty acquisition for dummy scans
acqDs, 1u
#include <epiDum.mod>
      goto goOn
bye, 1u
exit

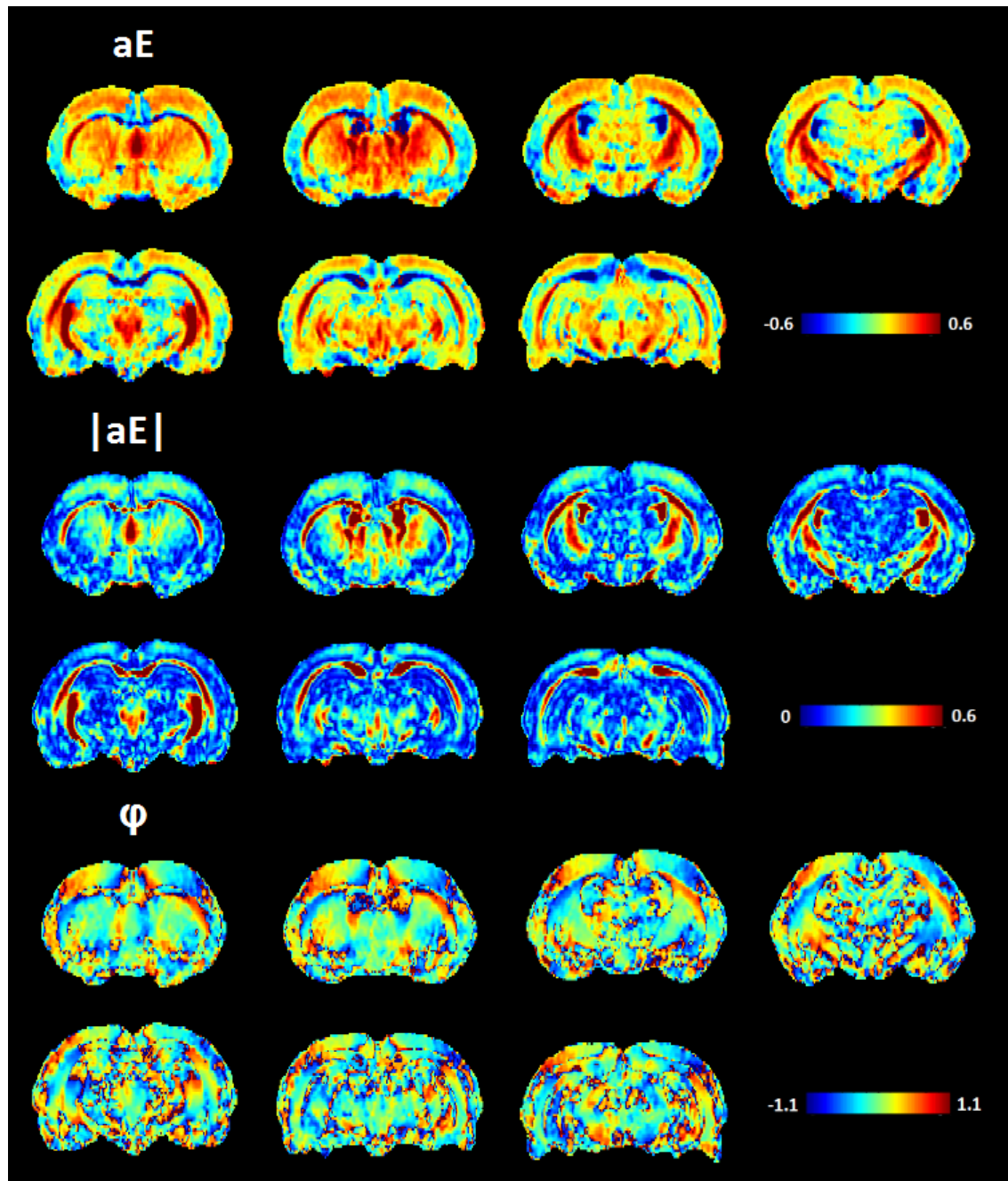
ph0 = 0 2
ph1 = 1

```

Ohjelma B.1: Kulmariippuvan d-PFG-sekvenssin toteuttava pulssiohjelmatiedosto. Tiedoston tärkeimmät kohdat on esitelty luvussa 4.



LIITE D: d-PFG-värikartat yhden eläimen kaikista leikkeistä



Kuva D.1: d-PFG-värikartat (aE , $|aE|$ ja φ) eläimen TM60 kaikista leikkeistä. Leikkeet on esitetty anterioisimmasta posterioirimpaan.

LIITE E: Kaikkien eläinten ROI-arvot

Taulukko E.1: Kaikkien eläinten ROI-arvot ja alueiden sisäiset keskihajonnat in vivo -mittauksista.

	TM45			TM59			TM60			TM61		
	CC vasen	CC oikea		CC vasen	CC oikea		CC vasen	CC oikea		CC vasen	CC oikea	
<i>FA</i>	0,7083±0,0876	0,7223±0,0899		0,6830±0,0730	0,6682±0,0958		0,5457±0,1008	0,5376±0,1207		0,5923±0,1235	0,6268±0,1062	
<i>aE</i>	-0,3136±0,4626	-0,3072±0,5069		-0,0780±0,5280	-0,1811±0,4253		-0,3650±0,6333	-0,4164±0,6844		-0,1835±0,4253	-0,2011±0,4072	
<i> aE </i>	0,4607 ±0,2790	0,4912±0,2978		0,4525±0,2757	0,4027±0,2204		0,6193±0,3502	0,6259±0,3962		0,3945±0,2370	0,3886±0,2307	
φ	-0,1754±0,7793	0,0435±0,7423		-0,5911±0,7896	0,1693±0,8446		-0,2300±0,7379	0,0886±0,7257		-0,1970±0,8335	0,1624±0,7489	
	IC vasen	IC oikea		IC vasen	IC oikea		IC vasen	IC oikea		IC vasen	IC oikea	
<i>FA</i>	0,7863±0,0755	0,7657±0,0607		0,7695±0,0800	0,7356±0,0778		0,7460±0,0839	0,7175±0,0766		0,7567±0,0666	0,7616±0,0647	
<i>aE</i>	0,2279±0,0510	0,2157±0,0635		0,1903±0,0579	0,2005±0,0822		0,2036±0,0570	0,1482±0,0771		0,1839±0,0787	0,1218±0,0763	
<i> aE </i>	0,2279±0,0510	0,2157±0,0635		0,1903±0,0579	0,2005±0,0822		0,2036±0,0570	0,1501±0,0732		0,1846±0,0770	0,1323±0,0559	
φ	0,1808±0,2485	-0,2976±0,2197		0,0457±0,2993	-0,1080±0,2102		0,2143±0,2371	-0,1063±0,3239		0,3189±0,3589	0,0195±0,4789	
	VB vasen	VB oikea		VB vasen	VB oikea		VB vasen	VB oikea		VB vasen	VB oikea	
<i>FA</i>	0,3028±0,0745	0,2646±0,0754		0,2997±0,0848	0,2661±0,0662		0,2854±0,0640	0,2354±0,0524		0,2451±0,0748	0,2244±0,0587	
<i>aE</i>	-0,0044±0,1695	-0,0975±0,1147		-0,0678±0,1397	-0,1143±0,1631		0,0004±0,1284	0,0076±0,1498		0,0231±0,1606	0,0305±0,1522	
<i> aE </i>	0,1532±0,0704	0,1236±0,0852		0,1347±0,0757	0,1518±0,1281		0,1150±0,0544	0,1405±0,0485		0,1541±0,0448	0,1492±0,0364	
φ	-0,1627±0,6170	0,0992±0,7167		-0,0895±0,6617	0,0115±0,4847		-0,1574±0,4633	0,2290±0,3424		-0,2401±0,2332	0,2006±0,5989	
	S1 vasen	S1 oikea		S1 vasen	S1 oikea		S1 vasen	S1 oikea		S1 vasen	S1 oikea	
<i>FA</i>	0,2094±0,0833	0,1903±0,0763		0,1477±0,0437	0,1565±0,0582		0,2299±0,0332	0,2382±0,0341		0,1467±0,0324	0,1533±0,0370	
<i>aE</i>	0,0995±0,0897	0,0822±0,1032		0,0887±0,1161	-0,0078±0,1437		0,1103±0,0832	0,1095±0,0665		0,1447±0,1033	0,1038±0,1197	
<i> aE </i>	0,1217±0,0558	0,1208±0,0536		0,1341±0,0577	0,1295±0,0620		0,1285±0,0506	0,1183±0,0491		0,1651±0,0656	0,1440±0,0656	
φ	0,2199±0,5888	-0,1587±0,6178		0,3453±0,7227	-0,0009±0,8995		0,2046±0,6111	-0,2639±0,5534		0,2650±0,4730	-0,1228±0,6334	
	DG vasen	DG oikea		DG vasen	DG oikea		DG vasen	DG oikea		DG vasen	DG oikea	
<i>FA</i>	0,2711±0,0528	0,2929±0,0486		0,2131±0,0480	0,2327±0,0476		0,1968±0,0315	0,1887±0,0402		0,2153±0,0393	0,2088±0,0352	
<i>aE</i>	0,1579±0,0572	0,1517±0,0724		0,1516±0,0302	0,1750±0,0627		0,1526±0,0338	0,1568±0,0484		0,1662±0,0728	0,1427±0,0314	
<i> aE </i>	0,1579±0,0572	0,1517±0,0724		0,1516±0,0302	0,1750±0,0627		0,1526±0,0338	0,1568±0,0484		0,1662±0,0728	0,1427±0,0314	
φ	-0,0857±0,1371	0,0447±0,1639		-0,1757±0,2102	-0,0716±0,1746		0,0101±0,2190	-0,1604±0,3566		0,0498±0,2091	0,0429±0,2655	

Taulukko E.2: Kaikkien eläinten ROI-arvojen keskiarvot ja eläinten väliset keskihajonnat *in vivo* -mittauksista.

	CC vasen	CC oikea	IC vasen	IC oikea	VB vasen	VB oikea	S1 vasen	S1 oikea	DG vasen	DG oikea
<i>FA</i>	0,6323±0,0763	0,6387±0,0780	0,7646±0,0174	0,7451±0,0227	0,2832±0,0266	0,2476±0,0210	0,1834±0,0427	0,1846±0,0394	0,2241±0,0429	0,2308±0,0429
<i>aE</i>	-0,2350±0,1296	-0,2764±0,1085	0,2014±0,0195	0,1715±0,0440	-0,0122±0,0390	-0,0434±0,0731	0,1108±0,0242	0,0719±0,0544	0,1571±0,0485	0,1566±0,0537
$ aE $	0,4818±0,0963	0,4771±0,1091	0,2016±0,0192	0,1746±0,0398	0,1392±0,0185	0,1413±0,0127	0,1374±0,0192	0,1282±0,0116	0,1571±0,0485	0,1566±0,0537
φ	-0,2984±0,1964	0,1159±0,0605	0,1899±0,1127	-0,1231±0,1307	-0,1624±0,0616	0,1351±0,0994	0,2587±0,0632	-0,1366±0,1084	-0,0504±0,1939	-0,0361±0,2402

Taulukko E.3: Eläimen *TM45* ROI-arvot ja alueiden sisäiset keskihajonnat *ex vivo* -mittauksista.

<i>TM45</i>	CC vasen	CC oikea	IC vasen	IC oikea	VB vasen	VB oikea	S1 vasen	S1 oikea	DG vasen	DG oikea
<i>aE</i>	-0,4069±0,2429	-0,4684±0,2429	0,1248±0,1178	0,1252±0,0298	-0,1019±0,0838	-0,1126±0,0498	0,0672±0,0555	0,0527±0,0620	0,2376±0,0655	0,2008±0,0653
$ aE $	0,4503±0,1671	0,4684±0,1671	0,1248±0,0478	0,1252±0,0294	0,1268±0,0385	0,1200±0,0411	0,0793±0,0436	0,0696±0,0318	0,2376±0,0655	0,2008±0,0653
φ	-0,1883±0,5624	0,0643±0,5624	0,1926±0,4078	-0,2000±0,2227	-0,0147±0,4726	0,0637±0,4838	0,0688±0,3481	-0,1750±0,4499	-0,1878±0,1349	-0,0131±0,2205